

**Oligomere Aminopyrazole**  
**gegen die pathologische Aggregation**  
**des „Alzheimer-Peptids“**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
dem Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Katrin Hochdörffer  
aus Laumersheim

Essen 2009

Referent:	Prof. Dr. Thomas Schrader
Koreferent:	Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Mathias Ulbricht
Tag der Disputation:	17.06.2009

*Markus und meiner Familie*





Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von November 2005 bis August 2006 am Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg und von August 2006 bis März 2009 am Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen, durchgeführt.

### ***Danksagung***

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. G. Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Mathias Ulbricht danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Luitgard Nagel-Steger, Prof. Dr. Detlev Riesner und Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die gelungene Kooperation.

Bedanken möchte ich mich bei Anselm Horn und Prof. Dr. Heinrich Sticht für die erfolgreiche Kooperation.

Dem Arbeitskreis Haberhauer möchte ich für die Benutzung des CD-Geräts danken, insbesondere Petra Schneider, Eva Ziegler und Silvia Ernst für die Durchführung der CD-Messungen.

Herrn Wolfgang Meyer-Zaika danke ich für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.

Herrn Dipl. Ing. Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Zudem möchte ich Torsten Schaller für die unermüdliche Hilfe bei MacroModel-Problemen danken.

Ich danke Herrn Klaus Kowski für die freundliche Unterstützung bei technischen Problemen jeglicher Art.

Frau Ingeborg Reiter danke ich für die Hilfe bei bürokratischen Problemen.

Herrn Dipl.-Ing. Werner Karow und Herrn Dipl.-Ing. Winfried van Hoof danke ich für die Anfertigung der Massenspektren.

Für die Durchführung der analytischen HPLC danke ich Frau Heike Wöll.

Allen jetztigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die geistreichen Diskussion und die Unterstützung jeglicher Art. Dank gebührt auch der „Freitags-Frühstücksrunde“, wodurch das Wochenende auf eine sehr angenehme Art eingeläutet wurde.

Außerdem möchte ich mich bei dem „harten Kern“ der 5. Etage für so manch' witzige Koch-, Cocktail-, Spieleabende... bedanken! Mit euch wurde das Leben in Essen um so einiges schöner.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Kirstin Wenck und Eva Ziegler, nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für die fachlichen Diskussionen („Wie gut, dass wir darüber gesprochen haben“), die süßen Aufmunterungen (danke Ev'), die Kinoabende (danke Kirstin), das Quatschen, die spaßige Zeit und noch vieles, vieles mehr. Vielen Dank für eure Freundschaft!

Bei Silvia Ernst und meiner Schwester Aline möchte ich mich ebenfalls für das Korrigieren dieser Arbeit bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt besonders meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Meinem Mann Markus danke ich ganz besonders für die moralische, aber auch fachliche Unterstützung.

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

- [1] T. Schrader, D. Riesner, L. Nagel-Steger, F. Biesemeier, K. Hochdörffer, *Heterozyklische Verbindungen mit Wirkungen gegen neurodegenerative Erkrankungen*, Deutsches Patent DE 10 2006 015 140.2-43, **2006**.
- [2] K. Hochdörffer, *Neue  $\beta$ -Faltblattliganden zur Inhibierung der Aggregation des Amyloid  $\beta$ -Peptids*, Vortrag im Rahmen des 12. Workshops in Xanten: "Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung", Xanten, **2006**.
- [3] P. Rzepecki, K. Hochdörffer, T. Schaller, J. Zienau, K. Harms, C. Ochsenfeld, X. Xie, T. Schrader, Hierarchical Self-Assembly of Aminopyrazole Peptides into Nanorosettes in Water, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 586-591.
- [4] L. Nagel-Steger, B. Demeler, K. Hochdörffer, T. Schrader, D. Willbold, *Modulation of aggregate size and shape distributions of amyloid- $\beta$  peptide by a designed  $\beta$ -sheet breaker*, Poster NIC Workshop "From Computational Biophysics to System Biology CBSB08", Jülich, **2008** (NIC Series Volume 40, 333-336 (**2008**)).
- [5] J. März-Berberich, K. Hochdörffer, L. Nagel-Steger, T. Schrader, *Optimization of a new lead structure for Alzheimer's Peptide Ligands*, Poster The third Joint International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry, Las Vegas, **2008**.
- [6] K. Hochdörffer, J. März-Berberich, L. Nagel-Steger, T. Schrader, *Optimization of a new lead structure for Alzheimer's Peptide Ligands*, Poster 5<sup>th</sup> Status Symposium on „Interplay between Molecular Conformations and Biological Function“, Bad Kissingen, **2008**.
- [7] L. Nagel-Steger, B. Demeler, W. Meyer-Zaika, K. Hochdörffer, T. Schrader, D. Willbold, *Modulation of aggregate size- and shape-distributions of the amyloid- $\beta$  peptide by a designed  $\beta$ -sheet breaker*, *European Biophysics Journal* **2009**, in press.
- [8] J. März-Berberich, K. Hochdörffer, L. Nagel-Steger, T. Schrader, *Optimization of a new lead structure for Alzheimer's Peptide Ligands*, Poster 9<sup>th</sup> International Conference AD/PD "Alzheimer's and Parkinson Diseases: Advances, Concepts and New Challenges", Prag, **2009**.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Amyloidosen	1
1.2 Amyloide Strukturen	2
1.3 Die Alzheimer'sche Krankheit	3
1.3.1 APP-Prozessierung und Amyloid-Kaskaden-Hypothese	4
1.3.2 A $\beta$ -Fibrillogenese	6
1.3.3 Therapieansätze	9
<b>2 Problemstellung</b>	<b>20</b>
<b>3 Durchführung und Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1 Synthese des trimeren Pyrazolliganden	23
3.2 Synthese der Rezeptormoleküle	27
3.2.1 Überblick der neuen Liganden	39
3.3 Untersuchungen mit A $\beta$ (1-40) bzw. A $\beta$ (1-42)	42
3.3.1 Thioflavin T Messungen	42
3.3.2 CD-Spektroskopie	53
3.3.3 FCS-Messungen (AK <i>Willbold</i> )	58
3.3.4 Analytische Ultrazentrifugation (AK <i>Willbold</i> )	60
3.3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen	70
3.3.6 Diskussion	72
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>84</b>
4.1 Zusammenfassung	84
4.2 Ausblick	86
4.2.1 Weitere Untersuchungsmethoden	87
4.2.2 Strukturelle Optimierung	88
<b>5 Experimenteller Teil</b>	<b>91</b>
5. 1 Material und Methoden	91
5.1.1 Chemikalien	91

5.1.2 Lösungsmittel .....	91
5.1.3 Chromatographische Methoden .....	91
5.1.4 Schmelzpunktbestimmung .....	92
5.1.5 Spektroskopische Methoden .....	92
5.1.6 Verwendete Puffer.....	94
5.1.7 Molecular Modelling.....	94
5.2 Synthese.....	95
5.2.1 Synthese des Trimers <b>21</b> .....	95
5.2.2 Synthese der neuen Liganden.....	111
5.2.3 Lösungssynthese des Pentapeptids KLVFF .....	136
5.2.4 Manuelle Festphasensynthese der Pyrazolliganden .....	142
5.2.5 Synthese von 3-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäure-ethylester <b>90</b> .....	149
5.2.6 Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-1-(2-(isopropylamino)-2-oxoethylamino)-2-methyl-1-oxopro-panylcarbammat <b>93</b> .....	152
5.2.7 Synthese von Dilysin.....	154
5.2.8 Synthese von Trimer-Säure <b>98</b> .....	157
5.3 CD-Spektren.....	159
5.4 Thioflavin T-Messungen .....	162
<b>6 Anhang .....</b>	<b>171</b>
6.1 NMR-Spektren von 3-(3-Methylbutanamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester <b>66</b> .....	171
6.2 NMR-Spektren von 3-Pivalamido-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester <b>68</b> .....	172
6.3 NMR-Spektren von 3-(3-(2,6-Diaminohexanamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat <b>70</b> .....	173
6.4 NMR-Spektren von 3-(3-Palmitamido-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester <b>72</b> .....	174
6.5 NMR-Spektren von <i>N</i> <sup>ε</sup> -Amino-2-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-lysiny-carbonsäuremethylester-trifluoracetat <b>74</b> .....	175

6.6 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester 29.....	176
6.7 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester 21 .....	177
6.8 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester 33.....	178
6.9 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Amino-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat 35 .....	179
6.10 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäure 34 .....	180
6.11 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäure 36.....	181
6.12 NMR-Spektren von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido-6-( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-lysiny-carbonsäuremethylester 44 .....	182
6.13 NMR-Spektren von 6-Amino-2-(3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido-lysiny-carbonsäuremethylester 45 .....	183
6.14 NMR-Spektren von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido-6-( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-lysiny-carbonsäure 51 .....	184
6.15 NMR-Spektren von 6-(1-Cyclohexylehtylamino)-5-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido-6-oxo-hexylcarbammat 52 .....	185

6.16 NMR-Spektren von <i>N</i> -(6-Amino-1-(1-cyclohexylethylamino)-1-oxohexan-2-yl)-3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid-trifluoracetat 53 .....	186
6.17 NMR-Spektren von <i>N</i> -(1-Cyclohexylethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 46 .....	187
6.18 NMR-Spektren von <i>N</i> -(1-Cyclohexylethyl)-3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 47 .....	188
6.19 NMR-Spektren von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester 37 .....	189
6.20 NMR-Spektren von 4-(3-(3-(3-Nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester 38 .....	190
6.21 NMR-Spektren von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)butansäure 39 .....	191
6.22 NMR-Spektren von 4-(3-(3-(3-Nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)butansäure 40 .....	192
6.23 NMR-Spektren von <i>tert.</i> -Butyl-2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)ethylcarbammat 42 .....	193
6.24 NMR-Spektren von <i>N</i> -(2-Aminoethyl)-3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 43 .....	194
6.25 NMR-Spektren von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säureethylester 54 .....	195
6.26 NMR-Spektren von 1-(3-(3-(3-Nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säureethylester 55 .....	196



6.27 NMR-Spektren von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säure 56 .....	197
6.28 NMR-Spektren von <i>N</i> -(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-1-(4-methoxy-benzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbox-amido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 57 .....	198
6.29 NMR-Spektren von <i>N</i> -(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 58 .....	199
6.30 NMR-Spektren von <i>N</i> -(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexyletylamino)-2-oxoethyl)-1-(4-methoxy-benzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbox-amido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 49 .....	200
6.31 NMR-Spektren von <i>N</i> -(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexyletylamino)-2-oxoethyl)-3-(3-(3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamid 50 .....	201
6.32 NMR-Spektren von Trimer-KKKKKKG 59 .....	202
6.33 NMR-Spektren von Trimer-LPFFD 60 .....	203
6.34 NMR-Spektren von Trimer-KLVFF 61 .....	205
6.35 NMR-Spektren von Methyl-2-(2-( <i>tert</i> -butyloxycarbonylamino)-2-methylpropan-amido)-acetat 91 .....	207
6.36 NMR-Spektren von <i>tert</i> .-Butyl-1-(2-(isopropylamino)-2-oxoethylamino)-2-methyl-1-oxopropanylcarbammat 93 .....	208
6.37 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäuremethylester 97 .....	209
6.38 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carboxamido)-1 <i>H</i> -5-carboxamido)-1 <i>H</i> -pyrazol-5-carbonsäure 98 .....	210

<b>7 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>211</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>213</b>

## 1 Einleitung

Die Zahl der an altersbedingten Erkrankungen leidenden Personen wird sich auf Grund der demographischen Entwicklung in den nächsten Jahrzehnten drastisch erhöhen. Insbesondere werden die verschiedenen Demenzformen wie Morbus Alzheimer epidemiologisch eine bedeutende Rolle einnehmen. Nach neueren Prognosen werden in naher Zukunft allein an Morbus Alzheimer weltweit mehr als 100 Millionen Menschen leiden. Die pathophysiologischen Prozesse dieser neurodegenerativen Erkrankung sind immer noch nicht vollständig erforscht und die gegenwärtige Behandlung ist rein symptomatisch. Neben persönlichen und sozialen Schäden, welche die Erkrankung mit sich bringt, sind auch die volkswirtschaftlichen Aspekte von Relevanz.

### 1.1 Amyloidosen

Als Amyloidosen wird eine Klasse von Krankheiten bezeichnet, deren Ursache in der Proteinefehlfaltung liegt. Durch Akkumulierung dieser spezifisch fehlgefalteten Peptide oder Proteine kommt es zu einer Aggregation, die zu Ablagerungen im Gehirn führen kann.<sup>[1]</sup> Solche extrazellulären, fibrillären Ablagerungen, auch Plaques genannt, waren früher das charakteristische Merkmal der Amyloidosen. Heutzutage sind auch intrazelluläre Einschlüsse der Proteinaggregate symptomatische Kennzeichen der Erkrankung.<sup>[2]</sup>

Zu den Amyloidosen gehören neurodegenerative Krankheiten wie z.B. Morbus Alzheimer, die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, das Parkinson-Syndrom, Chorea Huntington, das Down-Syndrom und Diabetes mellitus. Mit Ausnahme des Diabetes mellitus weisen alle anderen Krankheiten neuronale Ausfälle beim Patienten auf. Für die meisten neurodegenerativen Krankheiten sind die fehlgefalteten, aggregierten Proteine bereits identifiziert. Je nach Krankheit sind andere Proteine involviert, die sich in ihrer Sequenz und nativen Struktur unterscheiden, aber die fehlgefaltete fibrilläre Struktur gemeinsam haben.<sup>[3]</sup> **Tabelle 1** zeigt einen Überblick einiger weniger neurodegenerativer Krankheiten.

**Tabelle 1:** Merkmale einiger neurodegenerativen Krankheiten.<sup>[4]</sup>

Krankheit	Auftreten/Übertragung	Involviertes Protein	Klinische Symptome
Alzheimer	sporadisch (95 %) geerbt (5%)	Amyloid- $\beta$ , Tau	Progressive Demenz
TSE (Transmissible Spongiform Enzephalopathien)	sporadisch (95 %) geerbt (5%) infektiös	Prion	Demenz, Ataxie, psychische Probleme, Schlafstörungen
Parkinson	sporadisch (geringer Anteil vererbt)	$\alpha$ -Synuclein	Bewegungsstörungen
Huntington	geerbt	Huntingtin	Demenz, motorische und psychiatrische Probleme
Amyotrophe laterale Sklerose	sporadisch (90 %) geerbt (10%)	Superoxid Dismutase	Bewegungsstörungen

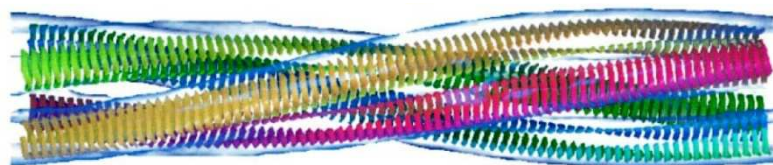
## 1.2 Amyloide Strukturen

Der deutsche Pathologe *Rudolf Virchow* führte im Jahr 1855 den Terminus „amyloid“ („stärkehaltig“) ein, nachdem er in menschlichen Geweben einige Ablagerungen mit einem Jod-Schwefelsäure-Gemisch blau, wie beim Nachweis von Stärke, anfärben konnte.<sup>[5,6]</sup>

Dieses Verfahren wurde von dem in der Histologie verwendeten Farbstoff Kongorot abgelöst.<sup>[7]</sup> Bei der Bestrahlung mit polarisiertem Licht zeigen mit Kongorot eingefärbte amyloide Fibrillen eine charakteristische grüne Doppelbrechungsfarbe.

Spätere elektronenmikroskopische Studien von *Cohen & Calkins*<sup>[8]</sup> ergaben, dass amyloide Ablagerungen geordnete, unverzweigte fibrilläre Strukturen mit einem Durchmesser von 5-10 nm und variablen Längen aufweisen.

*Eanes & Glenner*<sup>[9]</sup> fanden in röntgendiffraktometrischen Untersuchungen von isolierten amyloiden Fibrillen heraus, dass die Proteine in einer cross- $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegen, bei denen die Peptidrückgrate perpendicular zu der langen Fibrillenachse orientiert sind. Infrarotspektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Orientierung der polymerisierten Peptide antiparallel ist.<sup>[10]</sup> **Abbildung 1** zeigt eine verdrehte, aus vier Protofilamenten bestehende Fibrille.

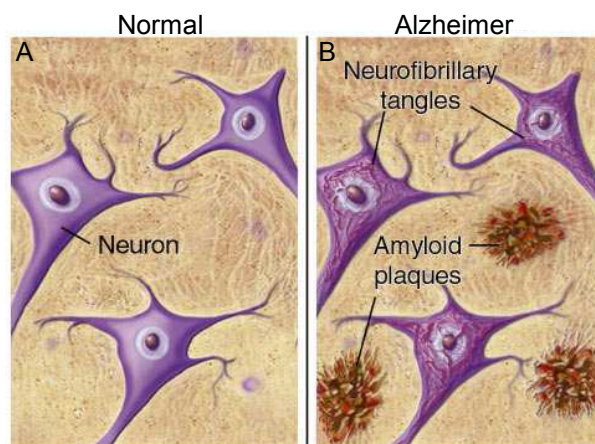
**Abb. 1:** Modell einer Insulin-Amyloidfibrille, die aus vier Protofilamenten besteht.<sup>[11]</sup>

### 1.3 Die Alzheimer'sche Krankheit

Die Alzheimer'sche Krankheit (*Alzheimer Disease*, AD) ist die am häufigsten vorkommende neurodegenerative Krankheit und wurde erstmals von Alois Alzheimer (1864-1915) im Jahr 1906 beschrieben.<sup>[12,13]</sup> AD ist die verbreitetste Form der senilen Demenz, die mit fortschreitendem Alter vermehrt auftritt. Die Wahrscheinlichkeit zu erkranken liegt für 65-74-jährige Personen bei etwa 3 %, für 75-84-jährige bei ca. 20 % und für Personen über 85 Jahre bei etwa 50 %.<sup>[14]</sup> Weltweit leiden etwa 20 Millionen Menschen an AD, wobei allein im Jahr 2006 rund 4.6 Millionen Patienten erkrankten.

Der klinische Krankheitsverlauf wird in drei Phasen eingeteilt: Der Beginn der Krankheit ist schleichend, anfängliche Symptome sind z.B. das Vergessen von Namen oder kürzlich erlebten Ereignissen. Dieses Frühstadium dauert zwei bis vier Jahre. Die zweite Phase wird durch Beeinträchtigungen des Kurzzeitgedächtnisses, Orientierungs- und Konzentrationsstörungen, sowie Persönlichkeitsveränderungen und Stimmungsschwankungen charakterisiert. Schließlich können die Patienten keine alltäglichen Aufgaben mehr erledigen, und sie erkennen die Familienangehörigen nicht mehr. Nach weiteren ein bis drei Jahren führt dies letztlich zum Tod des Patienten.<sup>[15]</sup>

Mit Gewissheit lässt sich die Diagnose der AD nur *post mortem* durch Untersuchung des Gehirns stellen. Hierbei können als charakteristische Merkmale intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (englisch: tangles) und extrazelluläre amyloide Ablagerungen gefunden werden (**Abbildung 2**).

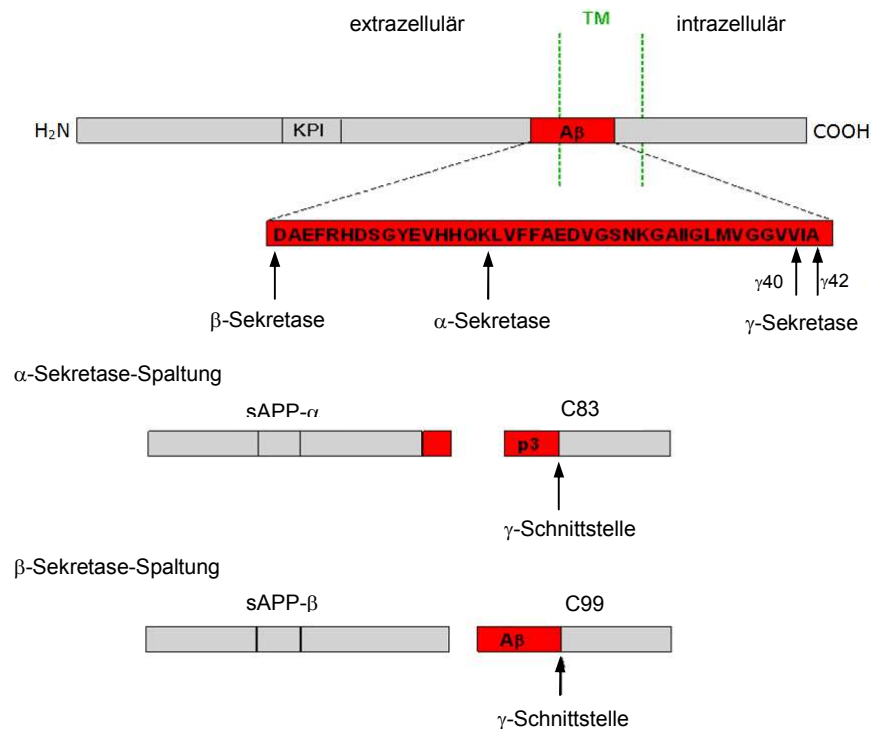


**Abb. 2:** A: Gesunde Neuronen. B: Pathologische Veränderungen, die bei Alzheimer Patienten im Gehirn auftreten. Zum einen sind die extrazellulären amyloiden Plaques und zum anderen die intrazellulären neurofibrillären Bündel (Neurofibrillary tangles, NFTs) nachzuweisen.<sup>[16]</sup>

### 1.3.1 APP-Prozessierung und Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Amyloid  $\beta$  ist ein 4 kDa großes Peptid, das durch die proteolytische Spaltung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP), ein Transmembranprotein mit unbekannter Funktion, generiert wird. APP, das eine lange extrazelluläre und eine kurze intrazelluläre Domäne besitzt, enthält für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase drei verschiedene proteolytische Schnittstellen.

1. Durch die Spaltung der  $\alpha$ -Sekretase entstehen ein lösliches Ectodomänen-Fragment (sAPP- $\alpha$ ), das in den extrazellulären Raum abgegeben wird, und ein C-terminales Fragment (C83). Letzteres besteht aus 83 Aminosäuren und bleibt in der Membran zurück.<sup>[17,18]</sup> Die Schnittstelle der  $\alpha$ -Sekretase befindet sich zwischen dem Lysin (16) und Leucin (17) der Sequenz des Amyloid  $\beta$ -Peptids (**Abbildung 3**). Die Spaltung des C83-Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase führt zu einem kurzen Oligopeptid, genannt p3 (A $\beta$ (17-40) oder A $\beta$ (17-42)).<sup>[19]</sup>
2. Wird APP zuerst von der  $\beta$ -Sekretase gespalten, so werden ein Ectodomänen-Fragment (sAPP- $\beta$ ) und ein C-terminales Fragment (C99) gebildet. Dieser Abschnitt von 99 Aminosäuren wird anschließend durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten: A $\beta$  wird freigesetzt. Abhängig von der Position resultieren unterschiedlich lange A $\beta$ -Peptide (zwischen 39 und 43 Aminosäuren). Vorherrschend werden A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42) gebildet. A $\beta$ (1-42) ist die pathogenere Variante die schneller zu einer Fibrillenbildung neigt.<sup>[20,21]</sup> Die hydrophoben C-terminalen Aminosäuren begünstigen die Ausbildung einer  $\beta$ -Faltblattkonformation.



**Abb. 3:** Schema der APP-Prozessierung. Die Sequenz des Aβ-Peptids ist rot markiert. Durch α-Sekretase und γ-Sekretase werden sAPP-α und p3 freigesetzt. Durch β-Sekretase und γ-Sekretase werden sAPP-β und Aβ gebildet (TM: Transmembran).

Die γ-Sekretase-Schnittstelle befindet sich in der Transmembranregion des APP, also in hydrophober Umgebung. Dies ist ungewöhnlich, da die Prozessierung Wasser benötigt. Ursprünglich wurde angenommen, dass dieser Spaltung eine Membranschädigung vorangehen müsse. Später stellte sich heraus, dass beide Peptide (Aβ(1-40) und Aβ(1-42)) ohne ein Anzeichen von Membranverletzungen in gesunde Zellen prozessiert werden.<sup>[22]</sup> Der Nachweis des Aβ-Peptids im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von Menschen, die nicht an der AD erkrankt sind, bestätigte die Vermutung, dass Aβ ein physiologischer Metabolit ist.<sup>[23]</sup> Im Gehirn eines Menschen entsteht zu ca. 85 % Aβ(1-40) und zu etwa 5-10 % das hydrophobere Fragment Aβ(1-42).<sup>[24]</sup>

Das Auftreten von hereditären Formen, die mit Mutationen innerhalb des APPs verbunden sind, deutet auf eine zentrale Rolle von APP in der Pathogenese der AD hin. Aus diesen Überlegungen wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese aufgestellt, die die Pathophysiologie der AD erklären kann:

Durch eine veränderte Prozessierung des APPs wird eine Erhöhung der Aβ-Produktion, vor allem von Aβ(1-42), verursacht. Anschließende Aggregation führt zur Fibrillenbildung und zur Ablagerung von diffusen Plaques. Diese amyloiden Ablagerungen schädigen die

Neuronen direkt oder induzieren inflammatorische Reaktionen, die die Zellen schädigen. Diese Vorgänge führen zu einer Störung des Stoffwechsels und zu oxidativem Stress. Als Folge davon wird das  $\tau$ -Proteins hyperphosphoryliert, welches ebenfalls filamentöse Aggregate bildet, die sogenannten neurofibrillären Bündel. Schließlich treten weitreichende neuronale Fehlfunktionen auf, die zur Neurodegeneration und dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten (Demenz) führen.<sup>[17,23]</sup>

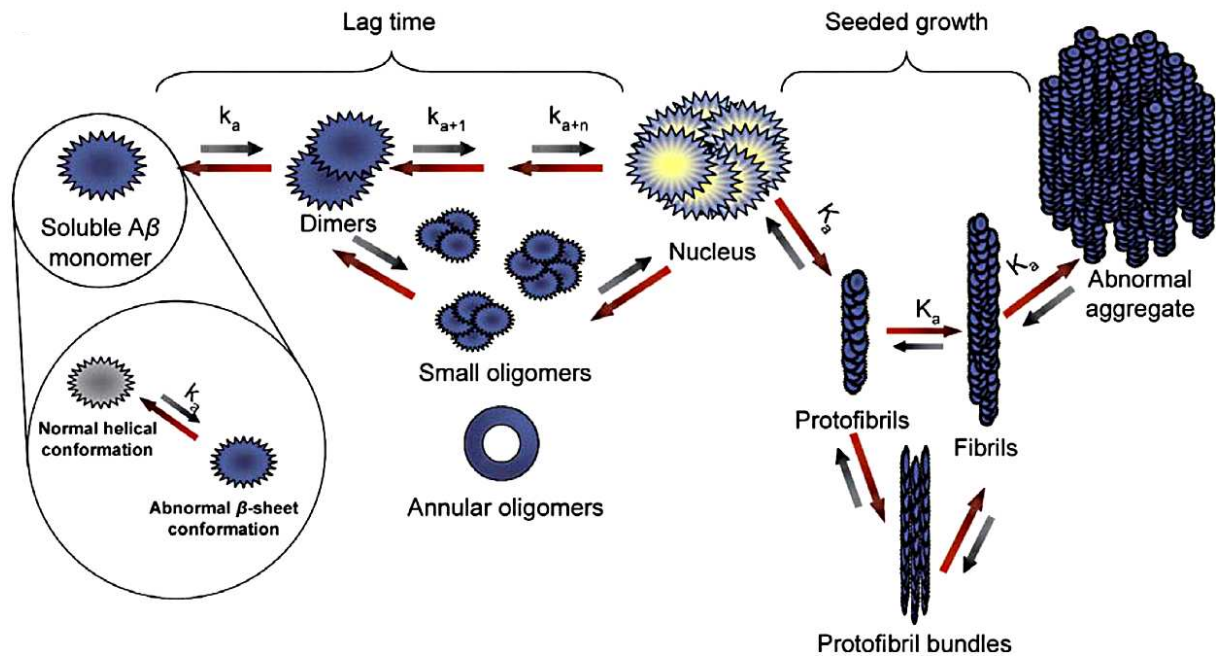
### 1.3.2 A $\beta$ -Fibrillogenese

Der Mechanismus der A $\beta$ -Aggregation ist noch nicht vollständig geklärt, wobei diverse Annahmen publiziert wurden.<sup>[25]</sup>

Ein etabliertes Modell der A $\beta$ -Fibrillogenese basiert auf einem keimabhängigen Polymerisationsmechanismus. Die zeitliche Entwicklung der Fibrillenbildung beinhaltet üblicherweise eine sogenannte „lag-phase“. Die „lag-phase“ ist die benötigte Zeitspanne, um einen Nukleus bzw. Nuklei zu erschaffen (**Abbildung 4**). Ihr folgt ein schnelles Wachstum der Fibrillen („seeded growth“), indem sich Monomere oder Oligomere mit dem Nukleus vereinigen. Wie auch bei anderen keimabhängigen Prozessen, z.B. der Kristallisation, führt die Zugabe zuvor hergestellter Aggregate (seeding) zu einer Verkürzung oder sogar zu einer Eliminierung der „lag-phase“.<sup>[26-31]</sup>

In diesem Modell beginnt die Fibrillogenese mit einer Sekundärstrukturänderung des Monomers von einer  $\alpha$ -helicalen zu einer  $\beta$ -faltblattreichen Struktur. Die in einer  $\beta$ -faltblattreichen Konformation vorliegenden A $\beta$ -Monomere lösen die Aggregation aus, welche kleine Oligomere, Protofibrillen, Fibrillen und schließlich größere Protein-Ablagerungen generiert. Unter den Aggregationsprodukten wird den kleinen globulären und ringförmigen Oligomeren die stärkste neurotoxische Wirkung zugesprochen.





**Abb. 4:** Schema der Aβ-Fibrillogenese. Die Fibrillogenese ist eine keimabhängige Polymerisation, charakterisiert durch eine „lag-phase“, der eine schnelle Wachstumsphase folgt.<sup>[25]</sup>

Untersuchungen von *Sengupta et al.* ergaben, dass die Fibrillenbildung von Aβ(1-40) bzw. Aβ(1-42) oberhalb einer kritischen Konzentration einsetzt.<sup>[32]</sup> Bei sehr geringen Konzentrationen bleibt Aβ(1-40) für mehrere Tage löslich, wohingegen Aβ(1-42) sehr schnell Fibrillen bildet.<sup>[26,33,34]</sup> Also aggregieren die beiden Peptide auf unterschiedliche Arten.<sup>[35,36]</sup> Die zwei Aminosäuren des C-terminalen Bereichs, Isoleucin und Alanin, werden bei der Aggregation als entscheidend angesehen. Die beiden hydrophoben Aminosäuren begünstigen anscheinend die Aggregation. Isoleucin soll dabei für die Bildung der Nuklei und Alanin für die Selbstassoziation der Nuklei erforderlich sein.<sup>[37,38]</sup>

Aufgrund von Experimenten mit dem Aβ-Peptid wird der Sequenzabschnitt Aβ(17-21) ebenfalls als ausschlaggebend für die Aggregation angesehen.<sup>[39-41]</sup> Übereinstimmend mit dem beschriebenen Modell stehen Aβ-Monomere im Gleichgewicht zwischen einer α-helicalen und einer β-Faltblattkonformation, wobei nur die in der β-Faltblattkonformation vorliegenden Monomere zur Aggregation fähig sind und aus dem Gleichgewicht entfernt werden können.

2005 wurde von *Teplow et al.* berichtet, dass die Bildung eines β-Turns in der Aβ-Sequenz (24-28) die monomere Konformation induziert, die zur Fibrillenbildung benötigt wird.<sup>[36]</sup> AFM (*atomic force microscopy*) Studien deuten darauf hin, dass Dimere, Tetramere, und Octamere mit β-Faltblattstruktur die eigentlichen assemblierenden Intermediate sind.<sup>[42]</sup>

*Kirkitadze et al.* definierten ein Modell basierend auf dem Nachweis, dass ein  $\alpha$ -helicales, oligomeres Intermediat in dem Prozess der Fibrillogenese akkumuliert.<sup>[43]</sup> Der Übergang zu einer  $\beta$ -Faltblattkonformation findet folglich auch auf der oligomeren Ebene statt. Kleine, lösliche Oligomere („low-molecular-weight“) besitzen eine  $\alpha$ -helicale Struktur, wohingegen größere, unlösliche Oligomere („high-molecular-weight“) nur eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweisen.<sup>[44]</sup> Ausgehend von Protofibrillen ist die Bildung von Fibrillen vermutlich durch die hydrophoben Kontakte zwischen drei und sechs Protofibrillen entropisch gesteuert. Eine Echtzeit Beobachtung des Fibrillenwachstums zeigte, dass die Reaktion ein kooperativer Prozess mit einer konstanten Elongationsgeschwindigkeit ist.<sup>[45]</sup>

In **Tabelle 2** sind die während der A $\beta$ -Fibrillogense entstehenden Intermediate mit ihren charakteristischen Eigenschaften aufgeführt.

**Tabelle 2:** Intermediate der A $\beta$ -Fibrillogenese.<sup>[25]</sup>

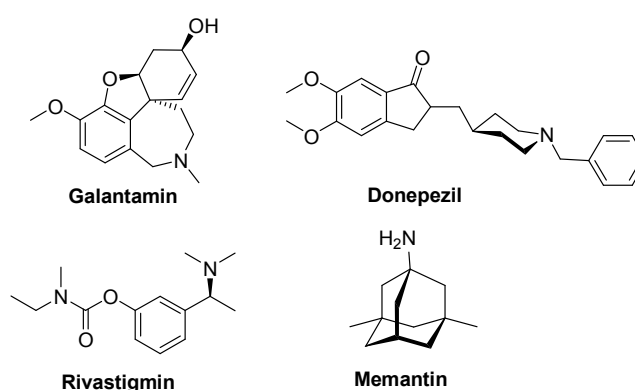
A $\beta$ -Spezies	Charakteristiken
Monomere	Lösliche, amphipathische Moleküle; von APP generiert; potentielle Konformationen: $\alpha$ -Helix, Random coil, $\beta$ -Faltblatt
Dimere	Intrazelluläre Lokalisierung <i>in vivo</i> , in menschlichen Gehirnen und <i>in vitro</i> ; hydrophober Kern; Durchmesser ca. 3-5 nm
Trimere	<i>In vivo</i> in Maus-Modellen beobachtet; potentielle Schlüsselrolle als Untereinheit der toxischen Oligomere
Kleine Oligomere	Sowohl bei AD-Patienten als auch in Maus-Modellen und <i>in vitro</i> beobachtet; heteromorph; bestehend aus 3-50 Monomeren; meist flüchtig und instabil, aber toxisch
Ringförmige Oligomere	In Zellkulturen und bei <i>in vitro</i> Experimenten beobachtet; potentielle Rolle als membranspaltende Poren oder Ionenkanäle
ADDLs (A $\beta$ -derived diffusible ligands)	Sowohl bei Murin und in menschlichen Hirnextrakten als auch <i>in vitro</i> beobachtet; nicht fibrillär; neurotoxisch; 17 - 42 kDa; Trimere bis 24mere
Protofibrillen	<i>In vitro</i> beobachtet; kurze, flexible, stabartige Struktur; maximale Größe 8 x 200 nm; bindet Kongorot und Thioflavin T; Vorläufer der reifen Fibrillen; toxisch
Fibrillen	Sowohl bei AD-Patienten als auch in Maus-Modellen und <i>in vitro</i> beobachtet; bindet Kongorot und Thioflavin T; stabile, filamentöse A $\beta$ -Aggregate, die aus sich wiederholenden A $\beta$ -Einheiten senkrecht zu der Fiber-Achse zusammengesetzt sind
Plaques	Sowohl <i>in vivo</i> bei AD-Patienten, als auch in Maus-Modellen beobachtet; große extrazelluläre A $\beta$ -Ablagerungen; vorwiegend Agglomeration von Fibrillen; nicht toxisch

Andere Ansätze diskutieren die Bildung reifer Fibrillen aus größeren Oligomeren oder die Entstehung der Protofibrillen durch eine Monomeraddition.<sup>[46]</sup> Allerdings herrscht Einigkeit darüber, dass die Assemblierungsstadien von A $\beta$  neurotoxische Eigenschaften besitzen.

### 1.3.3 Therapieansätze

Die Alzheimer'sche Krankheit ist eine progressive Erkrankung ohne Heilungschancen. Der Mechanismus auf molekularer Ebene ist nicht vollständig geklärt, wodurch die Entwicklung effektiver Therapieansätze erschwert wird. Die üblichen Behandlungsmethoden sorgen für eine kurzzeitige Linderung mancher Symptome. Nach der im Jahr 2008 herausgegebenen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Familienmedizin (DEGAM) werden folgende Antidementiva empfohlen<sup>[47]</sup>:

- Acetylcholinesterasehemmer: Galantamin **1** (Reminyl<sup>®</sup>), Donepezil **2** (Aricept<sup>®</sup>) und Rivastigmin **3** (Exelon<sup>®</sup>)
- *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonist: Memantin **4** (Axura<sup>®</sup>, Ebixa<sup>®</sup>).



**Abb. 5:** Strukturen von Galantamin **1**, Donepezil **2**, Rivastigmin **3** und Memantin **4**.

Generell besitzen die verwendeten Medikamente eine geringe Effizienz und können zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen.<sup>[48-50]</sup>

Derzeitige Therapieansätze verwenden neuroprotektive Wirkstoffe<sup>[51]</sup>, Antioxidantien<sup>[52]</sup>, anti-inflammatorische Mittel<sup>[53]</sup>, Metallchelatoren<sup>[54-64]</sup>, Cholinesterase Inhibitoren<sup>[65-68]</sup> und NMDA (*N*-Methyl-*D*-Aspartat) Rezeptor-Antagonisten.<sup>[69,70]</sup>

Gemäß der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ zielen zurzeit die meisten therapeutischen Forschungsansätze auf die Beeinflussung der Amyloid-Kaskade. Die Bildung der neurotoxischen A $\beta$ -Aggregate soll inhibiert oder bereits gebildete Aggregate aufgelöst werden. Führende Methoden sind die A $\beta$ -Immunisierung<sup>[71,72]</sup>, die Inhibierung der A $\beta$ -

Bildung<sup>[73,74]</sup> und die Erhöhung der A $\beta$ -Clearance durch spezifische Proteasen oder proteolytische Mechanismen.<sup>[75]</sup>

Folgende Ansätze, die Bildung des A $\beta$ -Peptids zu hemmen, werden verfolgt:

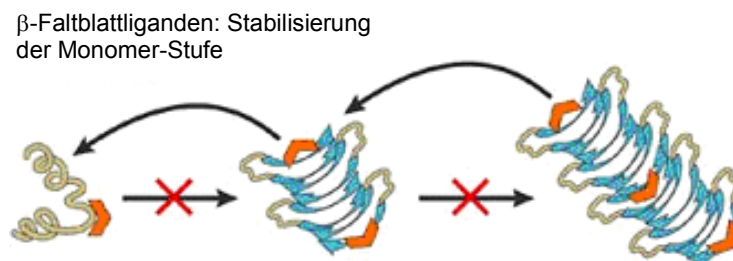
- Inhibierung der  $\beta$ -Sekretase<sup>[76-81]</sup>
- Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase<sup>[82,83]</sup>
- Inhibierung der A $\beta$ -Polymerisation.

Nachstehend wird die Inhibierung der A $\beta$ -Polymerisation näher erläutert, ein Ansatz, der auch im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wird.

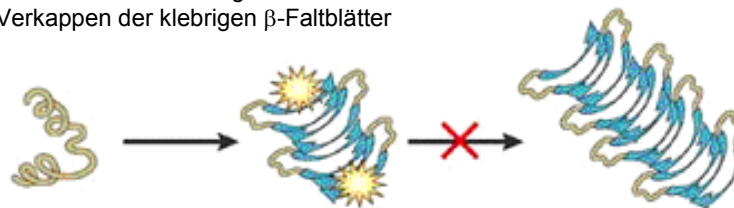
#### *1.3.3.1 Inhibierung der A $\beta$ -Polymerisation*

Die Inhibierung der A $\beta$ -Polymerisation wird unter Verwendung kleiner Moleküle, die an A $\beta$ -Monomere binden und eine Assemblierung zu den cytotoxischen Oligomeren verhindern, erreicht. Die Substanzen könnten nach der Bindung an die  $\beta$ -Faltblattstruktur diese entweder destabilisieren ( $\beta$ -sheet-breaker) oder eine Interaktion zwischen zwei A $\beta$ -Monomeren verhindern (**Abbildung 6**).

Andere Verbindungen binden an die klebrigen Stellen der  $\beta$ -Faltblattaggregate und hemmen so eine weitere Oligomerisierung. Die ausschließliche Blockade der Fibrillenbildung könnte jedoch zu einer ansteigenden Akkumulation von metastabilen Intermediaten wie z.B. toxischen Oligomeren führen, die den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen.



Inhibieren auf einer oligomeren Stufe durch  
Verkappen der klebrigen  $\beta$ -Faltblätter



**Abb. 6:** Darstellung für mögliche Inhibitoren der A $\beta$ -Polymerisation.<sup>[84]</sup>

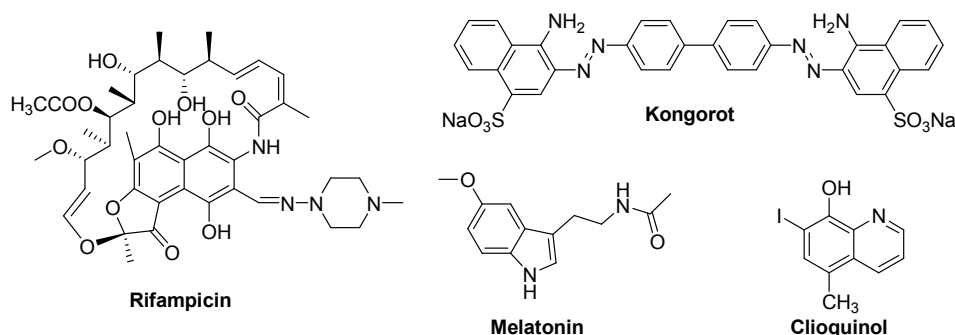
Mehrere Inhibitoren der A $\beta$ -Aggregation wurden durch das Screening großer Bibliotheken identifiziert, die sowohl synthetische als auch natürliche Verbindungen beinhalten. So wurden mehrere kleine Moleküle gefunden, die *in vitro* die A $\beta$ -Fibrillogenese inhibieren und/oder die Toxizität reduzieren können.<sup>[85]</sup>

Der an amyloide Fibrillen bindende Farbstoff Kongorot **5** (**Abbildung 7**) hemmt die A $\beta$ -Neurotoxizität, indem er die Fibrillenbildung inhibiert oder an vorgeformte Fibrillen bindet.<sup>[86]</sup> Farbstoffe wie Benzofuran-Derivate<sup>[87]</sup>, kleine sulfonierte Anionen und amphiphile Netzmittel<sup>[88]</sup> zeigen ebenfalls inhibierende Eigenschaften.

Rifampicin **6**, eigentlich ein Lepra-Medikament, verhindert die Aggregation des A $\beta$ (1-40)-Peptids und reduziert die Neurotoxizität.<sup>[89]</sup>

Ebenso positive Effekte zeigte Melatonin **7**, ein Medikament gegen Schlafstörungen.<sup>[90]</sup> Dieses interagiert mit dem A $\beta$ -Peptid und scheint einen Übergang von  $\beta$ -Faltblatt zu Random coil zu induzieren. Des Weiteren wirkt Melatonin oxidativem Stress entgegen.<sup>[91]</sup>

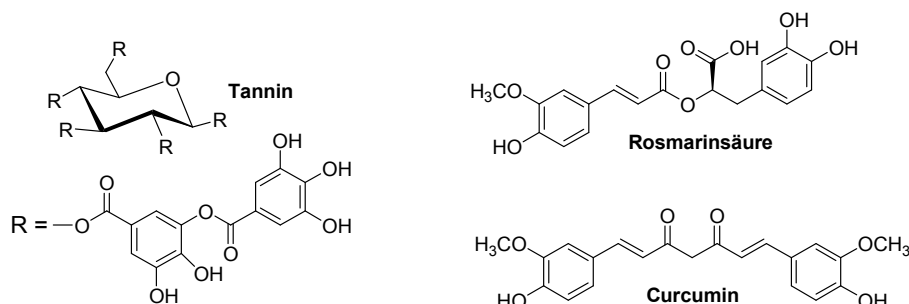
Clioquinol **8**, ein Chelator für Kupfer und Zink, soll die Agglomeration von A $\beta$ -Monomeren reduzieren.<sup>[92]</sup>



**Abb. 7:** Strukturen von Kongorot **5**, Rifampicin **6**, Melatonin **7** und Clioquinol **8**.

Aromatische Verbindungen, z.B. Nordihydroguaiaretische Säure und Polyphenole, die in Wein enthalten sind, hemmen die Fibrillogenese und lösen sogar bestehende Fibrillen wieder auf.<sup>[93]</sup> Tannin **9**, ebenfalls ein Polyphenol, konnte die Fibrillenbildung durch einen noch ungeklärten Mechanismus aufhalten (**Abbildung 8**).<sup>[94]</sup> Die Substanzen Curcumin **10** und

Rosmarinsäure **11** besitzen anti-amyloidogene Eigenschaften<sup>[95]</sup>, wobei Curcumin **10** sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt an kleine amyloide Spezies bindet und somit die Aggregation und Fibrillenbildung blockiert.<sup>[96]</sup>

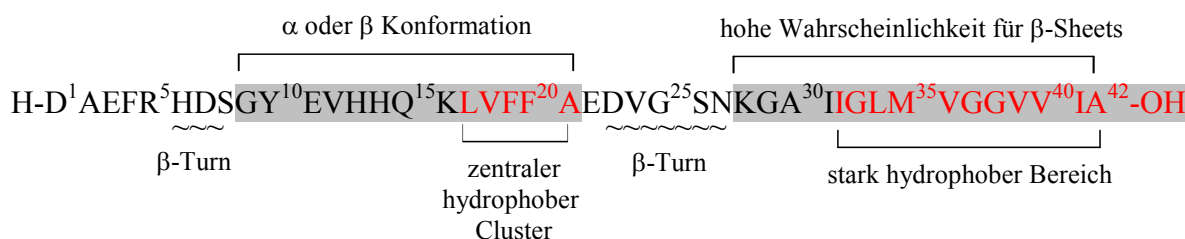


**Abb. 8:** Strukturen von Tannin **9**, Curcumin **10** und Rosmarinsäure **11**.

Die Nachteile einiger dieser Inhibitoren sind unter anderem die Toxizität, der ungeklärte Mechanismus und/oder der Mangel an Spezifität.

Daraufhin entwickelten mehrere Arbeitsgruppen maßgeschneiderte, peptidische Verbindungen, die spezifisch an A $\beta$  binden und dessen Aggregation inhibieren sollen. Dabei wurde das Ziel verfolgt, das Selbsterkennungsmotiv von A $\beta$  und die Funktion als  $\beta$ -sheet-breaker zu kombinieren.

*Hilbich et al.* zeigten, dass ein Bereich im hydrophoben Kern um die Reste 17-20 (KLVFF) für die Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausschlaggebend ist (**Abbildung 9**).<sup>[97]</sup>

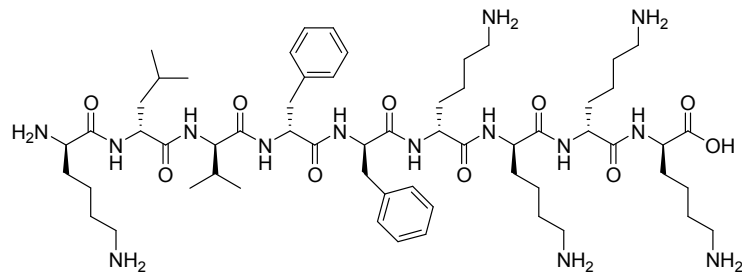


**Abb. 9:** Aminosäuresequenz von A $\beta$ (1-42). Dargestellt sind die Bereiche mit ihren angenommenen Konformationen.<sup>[97]</sup>

*Tjernberg et al.* fanden heraus, dass die hydrophobe Domäne KLVFF (16-20) des A $\beta$ -Peptids fundamental für die A $\beta$ -Protein-Protein-Interaktion ist. Diese Domäne bindet stereospezifisch unter Ausbildung einer anti-parallelen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur an die homologe Sequenz des A $\beta$ -Peptids.<sup>[98]</sup> Verantwortlich für diese Assoziation sollen die Aminosäuren Lysin, Leucin und das C-terminale Phenylalanin sein.<sup>[99]</sup>

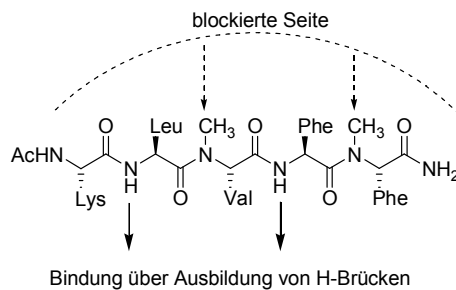
Als Selbsterkennungsmotiv wird daher bevorzugt die Sequenz 16-21 verwendet. Unter Verwendung dieses Motivs wurden folgende Strategien zur Verhinderung der Aggregatbildung entwickelt:

- Verknüpfung der Selbsterkennungssequenz mit geladenen Resten zur Reduzierung des hydrophoben Anteils, der die Proteinaggregation auslöst.<sup>[100-103]</sup> Die Aggregation toxischer A $\beta$ -Oligomere wird aufgrund einer erhöhten Oberflächenspannung beschleunigt.<sup>[103]</sup>



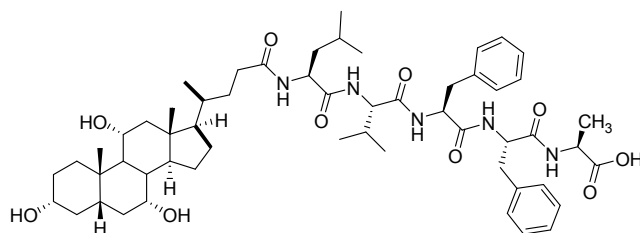
**Abb. 10:** Struktur von KLVFF-KKKK **12** nach *Murphy et al.*<sup>[100]</sup>

- *N*-Methylierung oder *N*-Alkylierung der Sequenz (16-21) zum Blockieren einer Bindungsseite.<sup>[104-109]</sup>



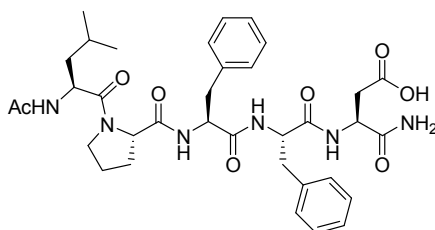
**Abb. 11:** Blockierung des Peptidrückgrats durch *N*-Methylaminosäuren.<sup>[105]</sup>

- Einführung sperriger Gruppen, die aus sterischen Gründen eine Anlagerung weiterer  $\beta$ -Faltblattstränge inhibieren.<sup>[110-112]</sup>



**Abb. 12:** Das von *Findeis et al.* entwickelte Peptid Choly-LVFFA-OH **13**.<sup>[110]</sup>

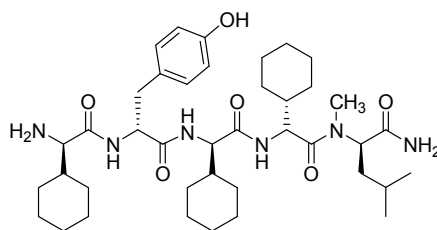
- Einführung der Aminosäure Prolin, welche als  $\beta$ -sheet-breaker fungiert.<sup>[113-115]</sup> Der ringförmige Aufbau des Prolins bewirkt einen Knick in der Struktur, wodurch die  $\beta$ -Faltblattstruktur des A $\beta$ -Peptids destabilisiert wird.



**Abb. 13:** Modifiziertes Peptid nach Soto.<sup>[113]</sup>

Die aufgeführten Verbindungen zeigten in *in vitro* und *in vivo* Experimenten inhibierende bzw. disaggregierende Wirkungen. Von Nachteil ist die begrenzte biochemische Stabilität, die Eigenschaft selbst Fibrillen zu bilden und/oder ihre Größe.

Kokkoni *et al.* zeigten in einer strukturellen Optimierung *N*-methylierter Inhibitoren, dass die Wirksamkeit der Peptide von der Position der *N*-Methylgruppe abhängig ist.<sup>[116]</sup> Mit dem D-Peptid D-[(chGly)-(Tyr)-(chGly)-(chGly)-(mLeu)]-NH<sub>2</sub> **14** (Abbildung 14) wurden die stärksten Effekte erzielt. Diese Verbindung scheint die Assemblierung der toxischen A $\beta$ -Oligomere zu nicht toxischen Fibrillen zu beschleunigen.



**Abb. 14:** Struktur von D-[(chGly)-(Tyr)-(chGly)-(chGly)-(mLeu)]-NH<sub>2</sub> **14** nach Kokkoni *et al.*.<sup>[116]</sup>

*N*-methylierte Peptide sind gegen Proteolyse widerstandsfähig, erhöhen die biologische Stabilität der Verbindung und sind wasserlöslich.

Anti-amyloidogene Eigenschaften wurden auch der Substanz Tramiprosat **15** (Alzhemed<sup>®</sup>, **Abbildung 15**) zugesprochen. Diese Substanz soll an lösliche A $\beta$ -Monomere binden und die Bildung bzw. die Ablagerung von Plaques im Gehirn verhindern.<sup>[117]</sup> Die Entwicklung wurde





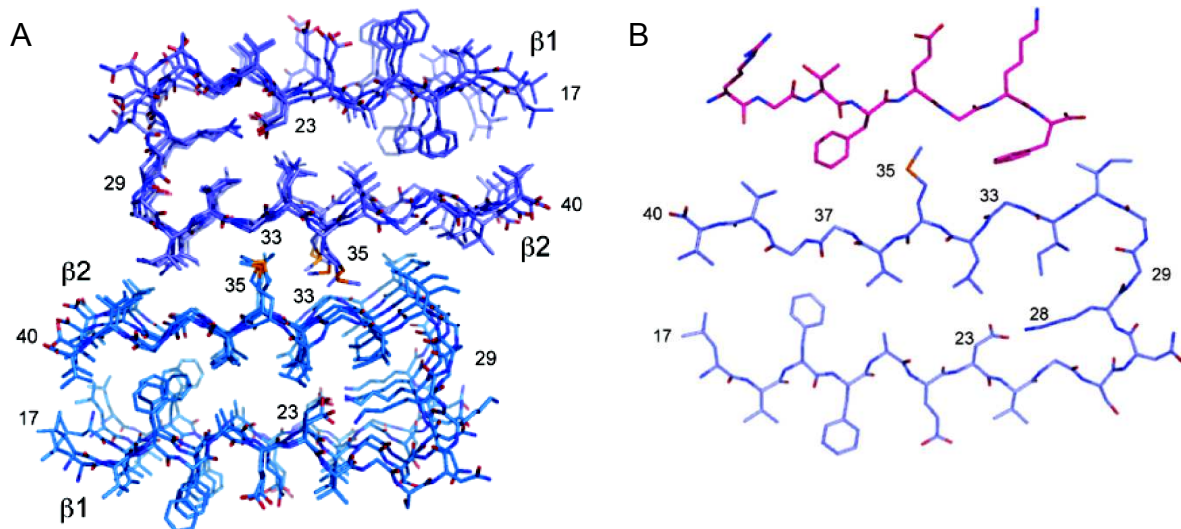
eine mögliche Erklärung dafür ist, dass A $\beta$ (1-42) die pathogenere Variante ist. Eine gezielte Oxidation des Methionins (35) des A $\beta$ (1-42)-Peptids verhinderte die Bildung der Paranuclei und es wurden Oligomere generiert, die in ihrer Größe und Morphologie nicht von denen des A $\beta$ (1-40)-Peptids zu unterscheiden waren.<sup>[123]</sup>

*Feng et al.* publizierten, dass bekannte Inhibitoren der A $\beta$ -Fibrillogenese wie z.B. DAPH (4,5-Dianilinphthalimid) oder Baicalein kolloidale Aggregate bilden und erst diese Kolloide die Agglomeration des A $\beta$ -Peptides wirksam hemmen.<sup>[124]</sup>

Obwohl in den letzten Jahren strukturelle Optimierungen vorgenommen und viele neue, kleine wirksame Moleküle entwickelt wurden<sup>[125-128]</sup>, sind derzeit sehr wenige strukturelle Aufklärungen über die Interaktionen der Inhibitoren mit dem A $\beta$ -Peptid bekannt.

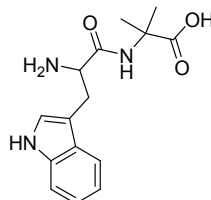
Detaillierte strukturelle Informationen über eine Ligand-Peptid-Wechselwirkung wurden von *Sato et al.* publiziert.<sup>[129]</sup>

Amyloide Fibrillen liegen in einer „cross- $\beta$ -Struktur“ vor und weisen eine gewellte Oberfläche auf (**Abbildung 18A**).<sup>[130-132]</sup> Diese Strukturbeschaffenheit machten sich *Sato et al.* zu Nutze, um eine neue Klasse von Inhibitoren zu entwickeln. Mit Hilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie konnten sie erkennen, dass ein Kontakt zwischen Methionin (Position 35) und Glycin (Position 33) in der gegenüberliegenden Fibrille im C-terminalen Bereich des A $\beta$ (1-40)-Peptids besteht (bei A $\beta$ (1-42): Methionin (35) und Glycin (37)). Daraufhin führten sie peptidische Verbindungen ein, die, basierend auf einer GxFxGxF Struktur (x steht für eine beliebige Aminosäure), eine Anlagerung von weiteren  $\beta$ -Faltblättern unterbrechen und die Bildung von reifen Fibrillen inhibieren können (**Abbildung 18B**). Die alternierenden großen und kleinen Aminosäuren in der Sequenz GxFxGxF wurden dabei so gewählt, dass sie komplementär zu den korrespondierenden Aminosäuren in dem IxGxMxG Motiv (31-37) sind, das in dem C-terminalen Bereich von A $\beta$ (1-40) bzw. A $\beta$ (1-42) gefunden wurde. Die Inhibitoren reduzierten signifikant die Toxizität *in vitro*.



**Abb. 18:** A: Modell der Struktur der Aβ(1–40)-Fibrillen. B: Festkörper-NMR-Struktur des Liganden H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-RGTFEGKF-CONH<sub>2</sub>, der an ein Aβ(1–40)-Monomer gebunden ist.<sup>[129]</sup>

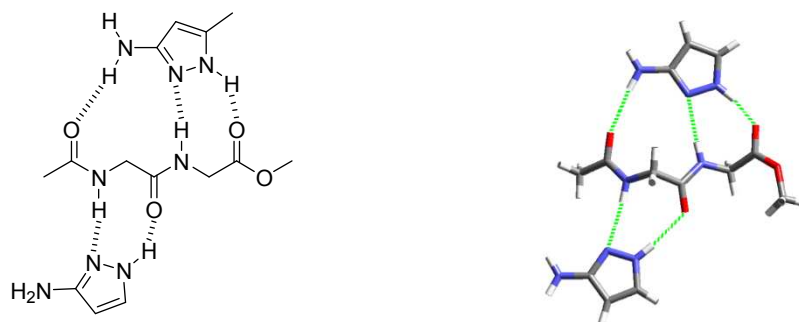
*Frydman-Marom et al.* identifizierten den Liganden D-Trp-Aib **18** als einen neuen, potenten Inhibitor (**Abbildung 19**), der die Bildung der toxischen Aβ-Oligomere verhindert.<sup>[133]</sup> Der Wirkmechanismus basiert einerseits auf der aromatischen Interaktion zwischen dem Tryptophan (Trp) und den Phenylalaninen an den Positionen 19 und 20 in dem Aβ-Peptid (NMR-spektroskopisch belegt) und andererseits auf der Funktion der *Aminoisobuttersäure* (Aib) als β-Faltblattbrecher.



**Abb. 19:** Struktur von D-Trp-Aib **18**.<sup>[133]</sup>

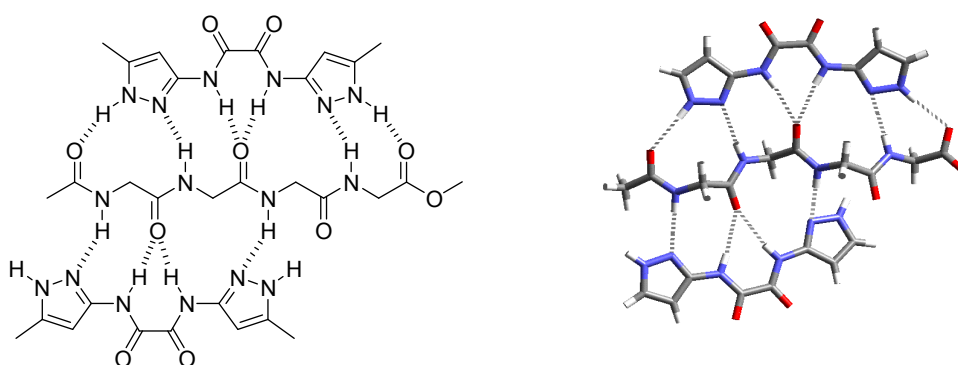
Mit dieser Verbindung wurde die Zahl an amyloiden Ablagerungen im Gehirn von transgenen Mäusen signifikant reduziert und die kognitiven Fähigkeiten verbessert. Laut Autoren scheint die Inhibierung kleiner Oligomere ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung der AD zu sein.

Ein neuer Ansatz waren die von *Schrader* und *Kirsten* entwickelten  $\beta$ -Faltblattmimetika, die aus monomeren und acylierten Aminopyrazolen bestehen.<sup>[134]</sup> Diese gehen in unpolaren, organischen Lösungsmitteln Komplexe mit Dipeptiden ein, indem sie das Rückgrat der Peptide erkennen. Durch ihr Donor-Akzeptor-Donor Bindungsmotiv (D-A-D) sind sie ideal komplementär zu dem Akzeptor-Donor-Akzeptor Motiv (A-D-A) des Peptids. Mittels NMR-Experimenten und Kraftfeldrechnungen konnte gezeigt werden, dass die Aminopyrazole das Rückgrat des Peptids über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren (**Abbildung 20**).



**Abb. 20:** Stabilisierung eines  $\beta$ -Faltblattes durch ein Aminopyrazol in einem Dipeptid nach *Kirsten* und *Schrader* (Cerius<sup>2</sup>, Molecular Simulations, Dreiding 2.21).<sup>[135]</sup>

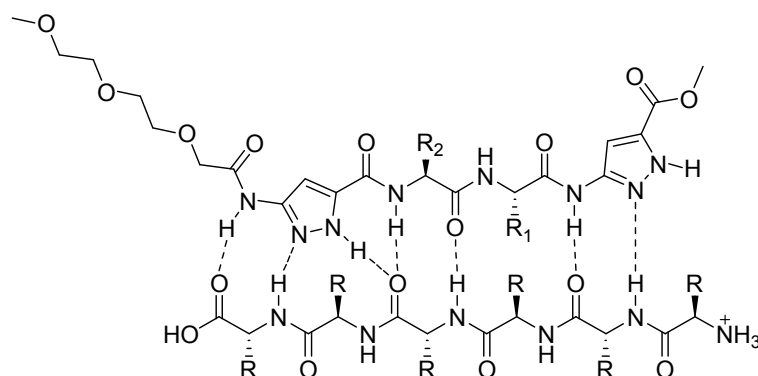
Auf diesen Ergebnissen aufbauend konnten *Schrader* und *Wehner* neue Rezeptoren erhalten, die selektiv kleine Peptidsequenzen erkennen und mit einer hohen Affinität an diese binden können. Hierzu wurden zwei Aminopyrazoleinheiten kovalent über verschiedene Dicarbonsäuren verknüpft. Diese zweite Generation an Liganden wiesen ebenfalls ein D-A-D Bindungsmotiv auf, um das Peptid ideal komplexieren zu können. In **Abbildung 21** ist der Komplex zwischen einem dimeren Liganden und Tetraglycin abgebildet.<sup>[136, 137]</sup>



**Abb. 21:** Komplex zwischen einem dimeren Liganden und Tetraglycin (MacroModel 7.0, Amber\*, Chloroform).<sup>[137]</sup>

Dieses Konzept wurde optimiert, indem der zentrale Baustein (Aminopyrazol) durch eine unnatürliche, heterozyklische Aminosäure (3-Aminopyrazol-5-carbonsäure) ausgetauscht und mit proteinogenen Aminosäuren zu Hybridliganden kombiniert wurde.<sup>[138]</sup> Somit wurde das ideale Bindungsmotiv bewahrt und gleichzeitig ein Element, das sequenzspezifisch ist,

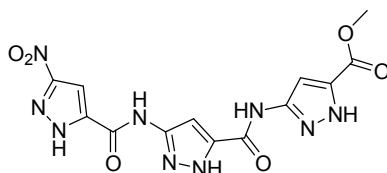
eingeführt.<sup>[139]</sup> Des Weiteren sollten die Hybridverbindungen durch den nicht natürlichen Heterozyklus gegen Proteolyse widerstandsfähig sein. Es konnten von *Schrader* und *Rzepecki* Liganden synthetisiert werden, die unter wässrigen Bedingungen eine Spezifität für die KLVFF-Sequenz des A $\beta$ -Peptids besitzen (**Abbildung 22**).<sup>[84,140]</sup>



**19:**  $R_1 = (CH_2)_4-NH_3^+$ ,  $R_2 = (CH_2)_4-NH_3^+$ ; **20:**  $R_1 = CH(CH_3)_2$ ,  $R_2 = (CH_2)_4-NH_3^+$

**Abb. 22:** Postulierter Komplex zwischen einem Hexapeptid und den Hybridliganden **19** bzw. **20**.<sup>[140]</sup>

Sowohl in *in vitro* Experimenten mit isoliertem A $\beta$  als auch in Zellkultur-Assays mit neuronalen Zellen<sup>[141,142]</sup> zeigten beide Liganden **19** und **20** vielversprechende inhibierende Effekte. Mittels iterativer Peptidsynthese konnten auch Kopf-Schwanz-verknüpfte, oligomere Pyrazolkomponenten erhalten werden. Dabei zeigte sich der aus drei Pyrazoleinheiten aufgebaute Ligand 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **21** (Trimer), der spezifisch an die KLVFF-Sequenz bindet, als potentester Inhibitor (**Abbildung 23**). In biophysikalischen Untersuchungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Dichte-Gradienten-Ultrazentrifugation wurden sowohl inhibierende als auch disaggregierende Wirkungen und in Zellkultur-Tests neuroprotektive Effekte mit dem Liganden beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung die Agglomeration kleiner Oligomere hemmt.<sup>[142]</sup>



**Abb. 23:** Darstellung des Liganden Trimer **21**.

## 2 Problemstellung

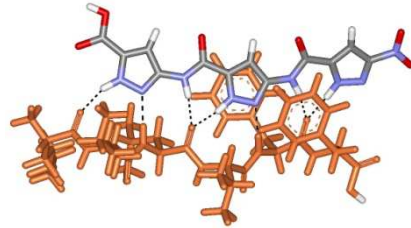
Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wird die Polymerisierung des Amyloid- $\beta$ -Peptides als Hauptursache der AD-Pathogenese angesehen. Aus therapeutischer und mechanistischer Sicht ist hierbei die Hemmung des pathologischen Aggregationsprozesses von besonderem Interesse. Die aktuelle Forschung zeigt, dass aromatische Verbindungen oder kurze Peptidsequenzen den Verlauf der A $\beta$ -Fibrillogenese zwar beeinflussen, jedoch intervenieren die meisten Moleküle mit dem Prozess unspezifisch oder sie sind proteolyselabil. Detaillierte strukturelle Informationen über die Interaktionen der Inhibitoren mit dem A $\beta$ -Peptid liegen noch nicht vor. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung neuer  $\beta$ -Faltblattliganden, die sich möglichst spezifisch über eine hohe Anzahl nicht kovalenter Wechselwirkungen an das A $\beta$ -Peptid binden und die Agglomeration inhibieren sollen.

In *in vitro* Experimenten zeigte der Ligand Trimer **21** (**Abbildung 23** (in 1.3.3.1)) mit dem A $\beta$ -Peptid sowohl inhibierende als auch disaggregierende Einflüsse auf die A $\beta$ -Fibrillogenese.<sup>[142]</sup> Auf diesen Resultaten aufbauend sollte der Ligand Trimer **21** als Leitstruktur verwendet und mit einer Vielfalt verschiedenster Reste modifiziert werden. Dabei sollten unter anderem Verbindungen eingeführt werden, die in Größe und Länge variieren und so funktionalisiert sind, dass sie komplementär an bestimmte Aminosäuren binden. Beispielsweise werden die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure von Ammonium- oder Guanidiniumionen gebunden, Carboxylationen binden die Aminosäuren Lysin und Arginin. Polare, ungeladene Gruppen, wie sie in Cystein, Serin und Threonin vorkommen, können mit Polyethylenglykol-Einheiten mehrfach Wasserstoffbrücken ausbilden.

Als Folge einer Verknüpfung von lipophilen und/oder sperrigen Resten mit dem trimeren Liganden könnte einerseits durch hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an das A $\beta$ -Peptid verstärkt und andererseits die Anlagerung eines weiteren  $\beta$ -Faltblattes verhindern werden.

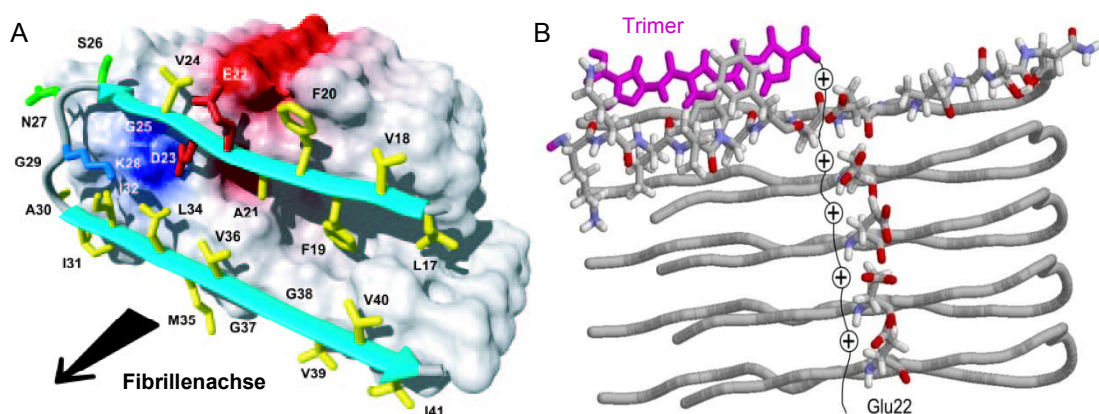
Des Weiteren sollte der Ligand Trimer **21** mit natürlichen, peptidischen Erkennungssequenzen (z.B. KLVFF, LPFFD) kombiniert werden, um selektiv an das Amyloid  $\beta$ -Peptid binden zu können.

In Monte-Carlo-Simulationen des Komplexes zwischen Trimer **21** und dem Modellpeptid KKLVFF in Wasser konnten neben zahlreichen Wasserstoffbrücken auch Kontakte der Pyrazolringe zu den Phenylalaninen des Hexapeptids erkannt werden (**Abbildung 24**).<sup>[84,140]</sup>



**Abb. 24:** Monte-Carlo-Simulation eines Komplexes zwischen dem Hexapeptid KKLVFF und dem Trimer **21**.<sup>[140]</sup>

Die Phenylalanine bilden dabei eine Art hydrophobe Tasche um den Liganden und stabilisieren den Komplex über  $\pi$ - $\pi$ -Stapel-Wechselwirkungen. Diese Beobachtung wurde in Molekül-Dynamik-Simulationen auch für den Komplex zwischen Trimer **21** und einem A $\beta$ -Monomer bestätigt.<sup>[143]</sup> Die von *Lührs* publizierte 3D-Struktur der A $\beta$ (17-42)-Protofibrille (**Abbildung 25A**) zeigt positiv (blau) und negativ (rot) geladene Oberflächenabschnitte.<sup>[144]</sup> Da die negativ geladene „Glutamat-Leiter“ (E 22) in der Nähe der postulierten Bindungsstelle (KL VFF, 16-20) des Trimers **21** liegt, soll der trimere Ligand mit einem polykationischen Rest verknüpft werden (**Abbildung 25B**).<sup>[143]</sup> Dabei sollen die Polykationen die „Glutamat-Leiter“ stabilisieren und so die Anlagerung einer weiteren U-förmigen Protofibrille verhindern.



**Abb. 25:** A: Konformation von A $\beta$ (17-42), erhalten aus H/D-Austausch-NMR-Spektroskopie. Die Farben gelb, grün, rot bzw. blau kennzeichnen die hydrophoben, polaren, negativ bzw. positiv geladenen Aminosäuren.<sup>[144]</sup> B: Komplex zwischen einer Protofibrille und Trimer **21**, das mit einem polykationischen Rest versehen ist.<sup>[143]</sup>

Nach erfolgreicher Synthese sollten die anti-aggregatorischen Effekte der neuen Liganden auf die A $\beta$ -Fibrillogenese mittels verschiedener biochemischer bzw. biophysikalischer Methoden *in vitro* untersucht werden. Vorgesehen war hier vor allem die Anwendung des Thioflavin T-Tests. Thioflavin T, ein Fluoreszenzfarbstoff, besitzt eine spezifische Affinität zu amyloiden Strukturen und kann Aggregate, die in einer  $\beta$ -faltblattreichen Konformation vorliegen, detektieren und quantifizieren.<sup>[145]</sup> Das Aggregationsverhalten der erfolgversprechendsten Liganden sollte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Willbold* an der Universität Düsseldorf mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) und Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) getestet werden.

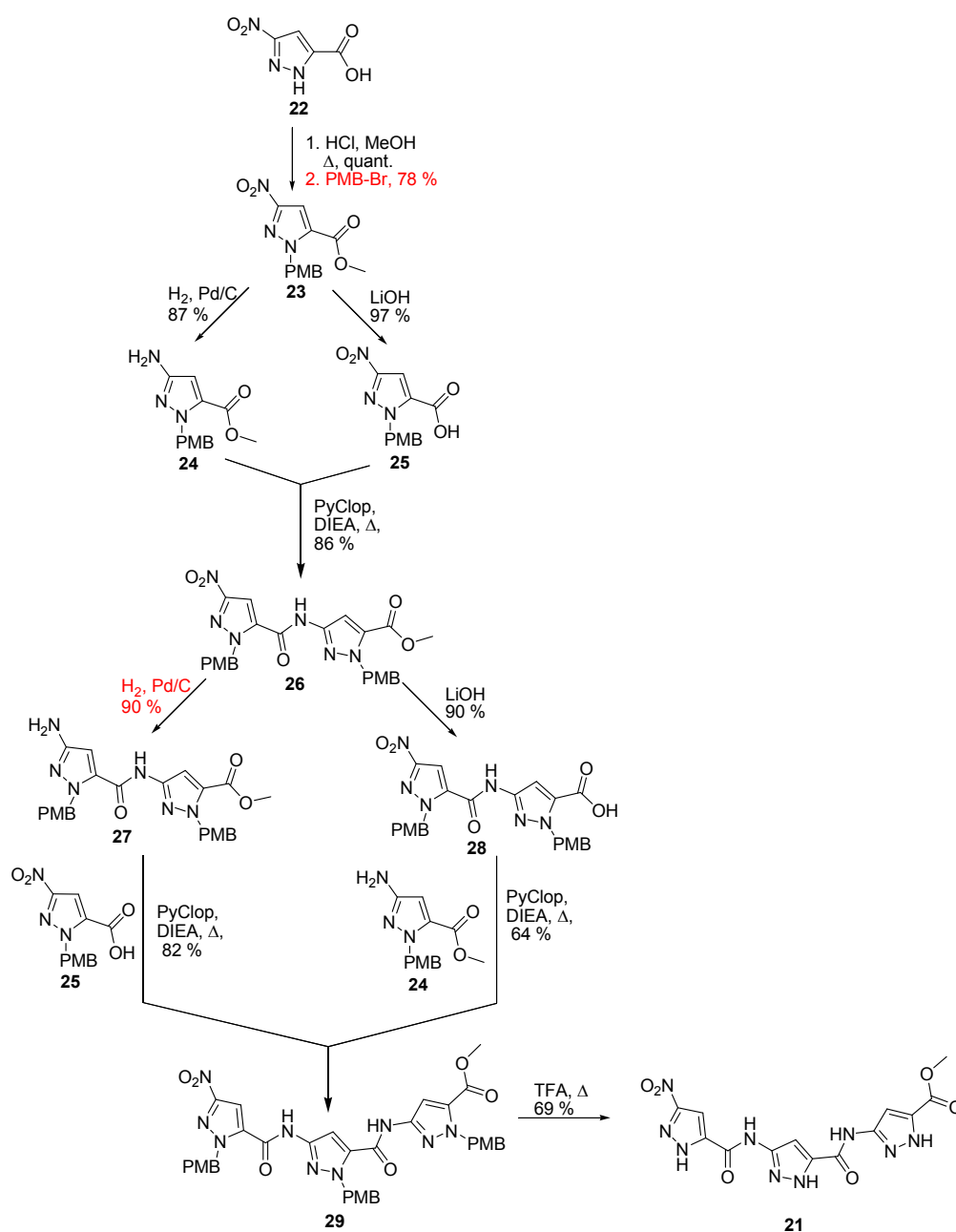
Anhand der erhaltenen Resultate sollte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung zwischen den neuen Liganden und dem A $\beta$ -Peptid ermittelt werden. Die Ergebnisse könnten wesentlich zur mechanistischen Aufklärung der Fibrillogenese beitragen und die Entwicklung neuer Wirkstoffe ermöglichen.



### 3 Durchführung und Ergebnisse

#### 3.1 Synthese des trimeren Pyrazolliganden

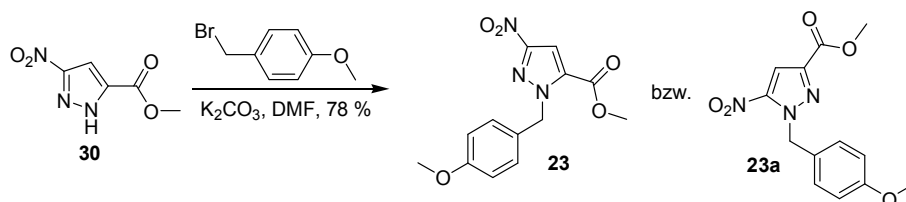
Aufbauend auf den vielversprechenden Resultaten mit dem Liganden Trimer **21**<sup>[142]</sup> sollte in dieser Arbeit zunächst dieser trimere Pyrazolbaustein, wie von *Rzepecki*<sup>[84]</sup> beschrieben, synthetisiert werden. In **Abbildung 26** ist das Syntheschema des Trimers **21** dargestellt.



**Abb. 26:** Syntheschema des Liganden Trimer **21**.

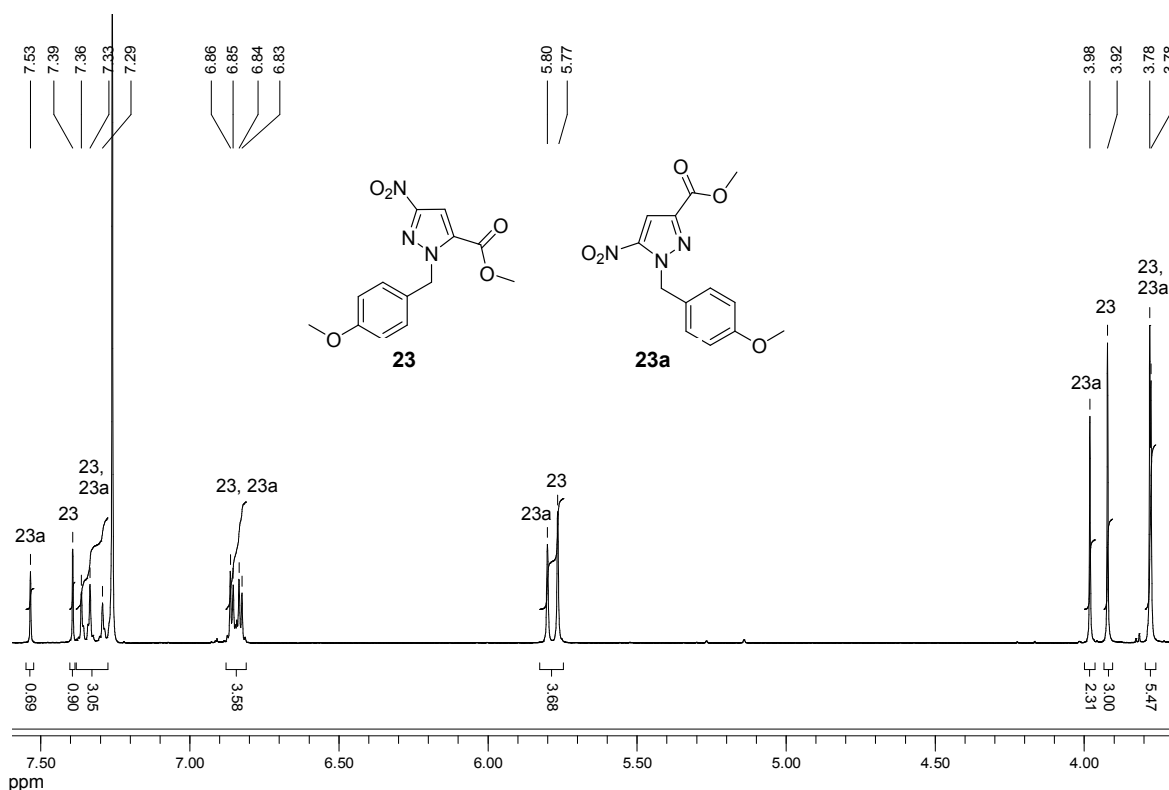
Bei der Darstellung des Liganden wurden an zwei Stellen Veränderungen (rot markiert) vorgenommen, die kurz erläutert werden sollen.

Die erste Modifikation wurde bei der Einführung der PMB-Schutzgruppe vorgenommen. Die PMB-Schutzung von 3-Nitro-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **30** erfolgte nach der Literaturvorschrift<sup>[146,147]</sup> mit *p*-Methoxybenzylbromid und Kaliumcarbonat in DMF in einer Ausbeute von 78 %.



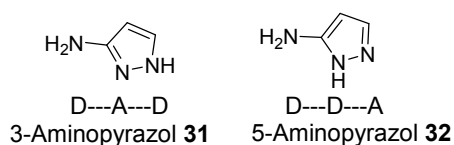
**Abb. 27:** Darstellung der PMB-Schutzung des unnatürlichen Aminopyrazolbausteins **23** bzw. **23a**.

Hierbei ist anzumerken, dass ein Gemisch aus zwei Regioisomeren **23** und **23a** entsteht. In **Abbildung 28** ist das  $^1H$ -NMR-Spektrum des Gemisches gezeigt. Wie zu erkennen ist, liegen die Isomere in unterschiedlichen Verhältnissen vor. Die Signale des Isomerengemisches sind teilweise um wenige ppm verschoben oder liegen übereinander, wodurch eine korrekte Auswertung der NMR-spektroskopischen Daten erschwert wird.



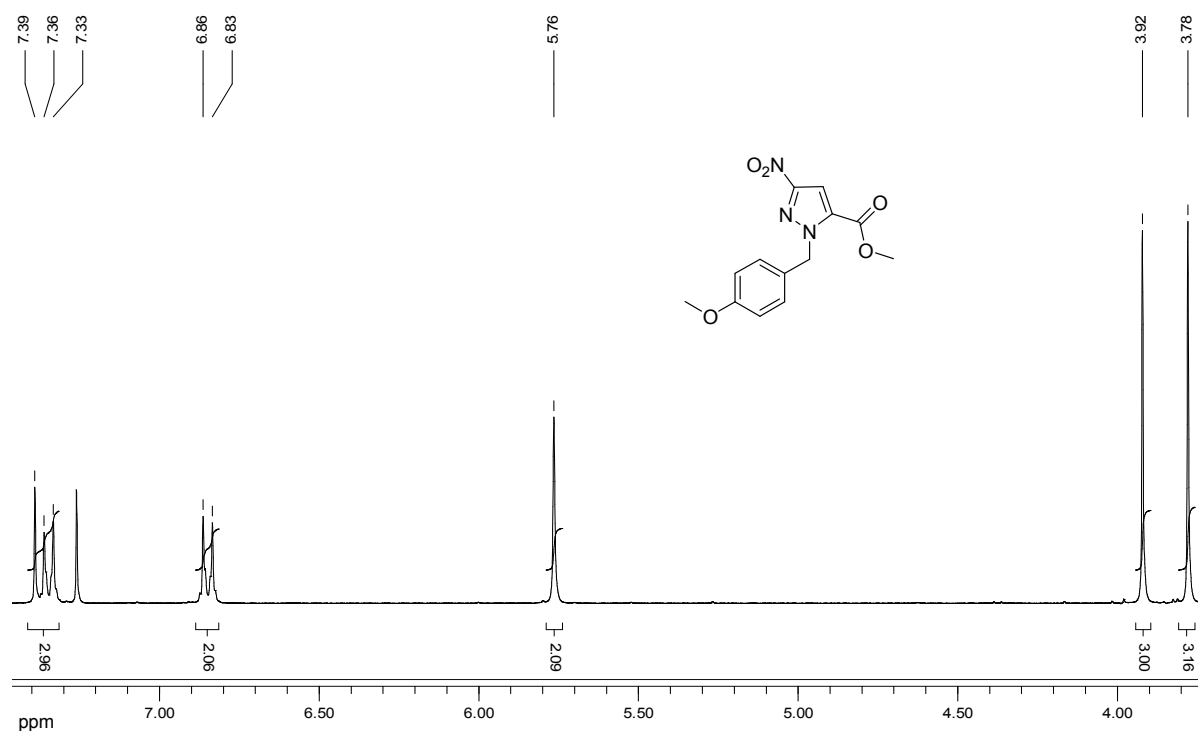
**Abb. 28:**  $^1H$ -NMR-Spektrum des Gemischs aus den Isomeren **23** und **23a**.

Prinzipiell können beide Isomere verwendet werden, da sie in der finalen Entschützung zum gleichen Liganden führen, der im tautomeren Gleichgewicht vorliegt (**Abbildung 29**). Das Gleichgewicht ist leicht auf die Seite des 3-Aminopyrazols **31** mit dem gewünschten Donor-Akzeptor-Donor-Bindungsmotiv verschoben.<sup>[148-151]</sup>



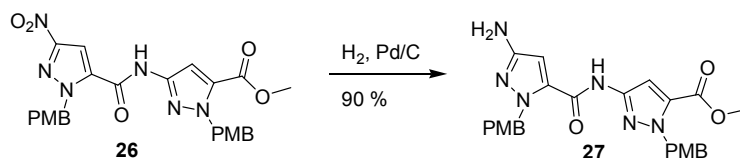
**Abb. 29:** Tautomere des monomeren Aminopyrazols mit ihrem Wasserstoffbrückenbindungsmuster.

In dieser Arbeit wurden die Regioisomere getrennt, weil dadurch eine Auswertung der NMR-spektroskopischen Daten, vor allem bei komplexeren Strukturen, vereinfacht werden konnte. Dazu wurde bei der Aufarbeitung anstelle einer säulenchromatographischen Reinigung des Rohprodukts die Reaktionslösung unter vermindertem Druck eingengt. Über Nacht kristallisierte nur eines der Isomere als farblose Substanz in einer Ausbeute von 78 % aus. In allen nachfolgenden Synthesen wurde nur dieses Isomer **23** eingesetzt. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ist in **Abbildung 30** zu sehen.



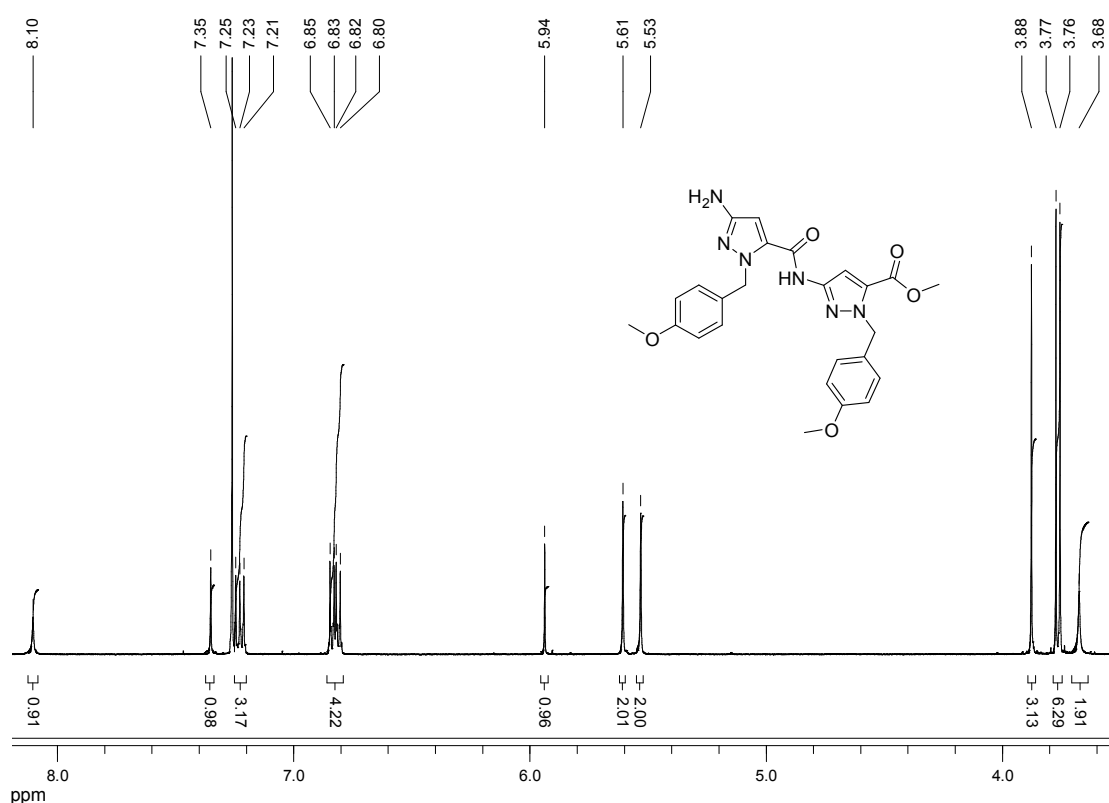
**Abb. 30:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Regioisomer **23**.

Die andere Veränderung wurde bei der katalytischen Hydrierung des dimeren Pyrazolbausteins **26** mit Palladium auf Aktivkohle vorgenommen.<sup>[152]</sup> Die dimere Amino-komponente **27** musste nicht, wie in den Vorarbeiten beschrieben, säulenchromatographisch gereinigt werden. Stattdessen konnte das Produkt **27** aus Methanol in einer 90 %igen Ausbeute kristallisiert werden.



**Abb. 31:** Darstellung der PMB-geschützten dimeren Verbindung **27**.

Diese Vereinfachung wurde möglich, da zu Beginn der Synthese die Regioisomere getrennt wurden und nur ein Isomer in der Synthese eingesetzt wurde. In **Abbildung 32** ist das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **27** dargestellt.

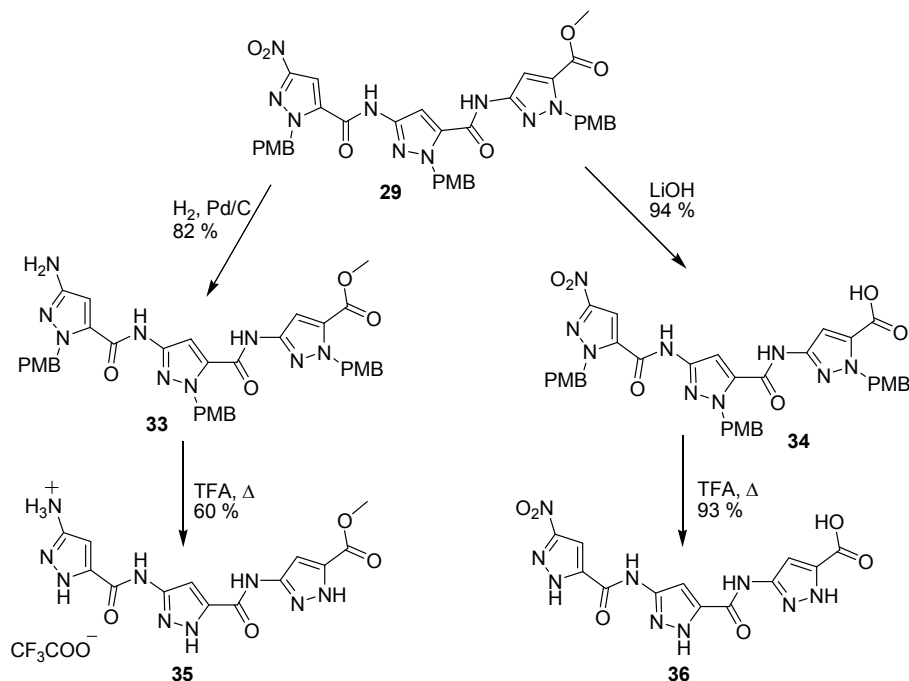


**Abb. 32:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **27**.

### 3.2 Synthese der Rezeptormoleküle

Zur Inhibierung der Aggregation des A $\beta$ -Peptids sollten neue Liganden, die als  $\beta$ -sheet-breaker wirken, synthetisiert werden. Da sich Trimer **21**, löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO), in biophysikalischen Untersuchungen und in Zellkultur-Tests als potenter Inhibitor zeigte, sollte diese Verbindung als Leitstruktur dienen. An diese Struktur **21** sollten diverse Moleküle oder Peptide gebunden werden, um eine anti-aggregatorische Wirkung zu erzielen. Dabei sollten auch Derivate mit einer für biologische Tests ausreichenden Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln dargestellt werden, da das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid das Aggregationsverhalten des A $\beta$ -Peptids beeinflusst.<sup>[153]</sup>

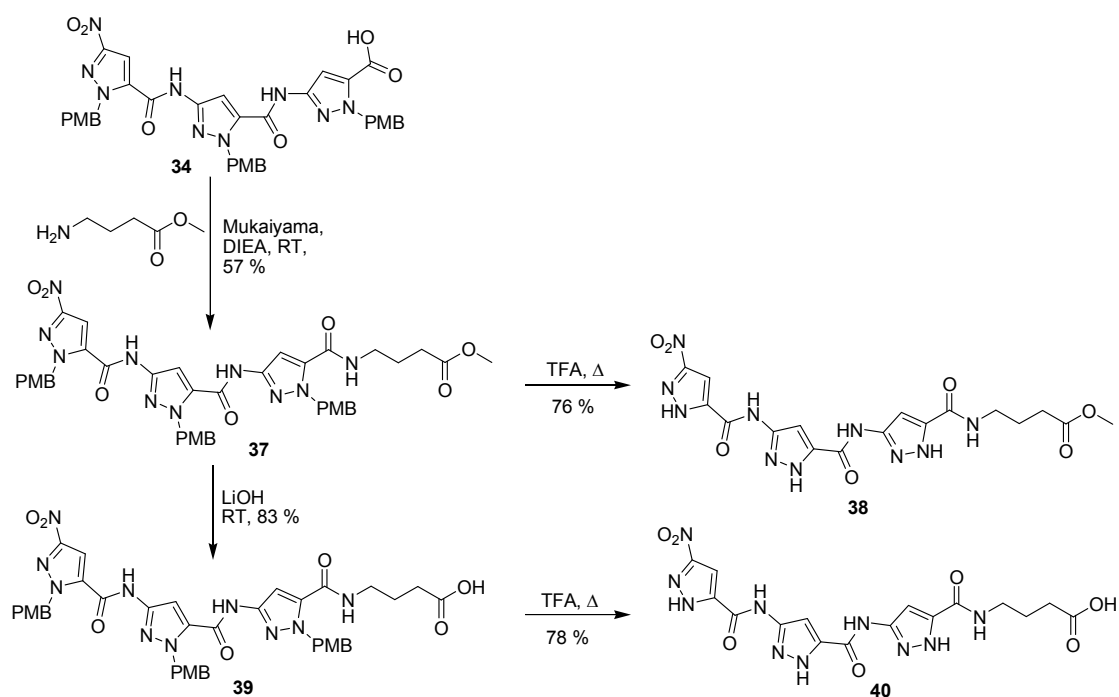
Die PMB-geschützte Komponente **29** wurde einerseits zu der Aminoverbindung **33** reduziert und andererseits zu der Säurekomponente **34** verseift (**Abbildung 33**).<sup>[154]</sup> Dies erfolgte hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle (82 %) bzw. basisch mit Lithiumhydroxid (94 %). Nach der sauren Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) konnten so zwei neue Liganden erfolgreich dargestellt werden.<sup>[155]</sup> Der basische Ligand **35** konnte in einer moderaten Ausbeute von 60 %, der saure Ligand **36** in einer sehr guten Ausbeute von 93 % isoliert werden.



**Abb. 33:** Darstellung der trimeren Liganden **35** und **36**.

Ausgehend von der Verbindung **34** sollten nun Liganden mit unterschiedlichen Funktionalitäten hergestellt werden, die über zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an das Amyloid- $\beta$ -Peptid verstärken können.

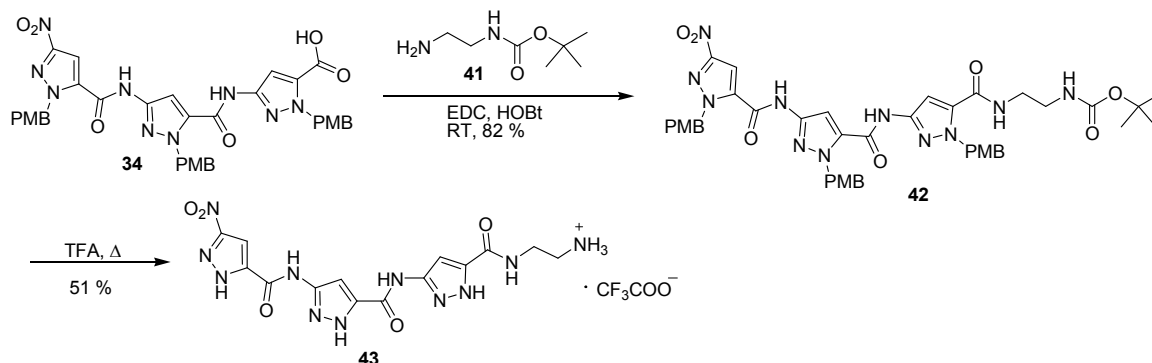
Zunächst wurde die PMB-geschützte Trimer-Säure **34** mit dem Aminosäurederivat  $\gamma$ -Aminobuttersäuremethylester (GABA-OMe) umgesetzt (**Abbildung 34**). Die Kupplung erfolgte in einer moderaten Ausbeute (57 %) mit dem kommerziell erhältlichen, C-terminal geschützten GABA-OMe und 2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid (*Mukaiyama-Reagenz*) in Dichlormethan.<sup>[156-158]</sup> Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde die Verbindung **37** einerseits mit Trifluoressigsäure zu dem Liganden **38** entschützt (76 %), andererseits basisch mit Lithiumhydroxid in einem Dreikomponenten-Lösungsmittelgemisch dealkyliert (83 %). Letzteres führte nach der Entfernung der Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure zu einem weiteren sauren Liganden **40** (78 %).



**Abb. 34:** Darstellung der Liganden Trimer-GABA **38** und Trimer-GABA-Säure **40**.

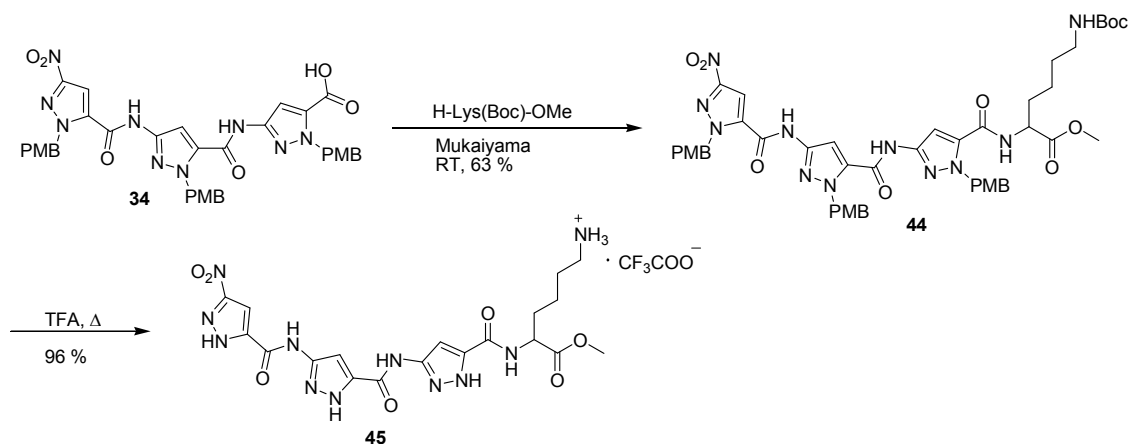
Basische Gruppen wurden eingeführt, um sowohl die Wasserlöslichkeit der Pyrazolderivate zu erhöhen als auch den hydrophoben Anteil, der für die Aggregation des A $\beta$ -Peptids verantwortlich ist, zu reduzieren. Die PMB-geschützte, trimere Nitropyrazol-carbonsäure **34** wurde mit dem einseitig Boc-geschützten Ethylendiamin **41** umgesetzt (**Abbildung 35**). Dies gelang mit dem Kupplungsreagenz EDC (*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und dem Additiv HOBt (1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol) in einer Ausbeute von 82 %.<sup>[159]</sup> Nach

der anschließenden sauren Entschützung der PMB-Gruppe ließ sich der basische Ligand **43** zu 51 % isolieren. Die Verbindung wurde als Trifluoracetatsalz erhalten und konnte nur in Dimethylsulfoxid gelöst werden.



**Abb. 35:** Synthese des Liganden **43**.

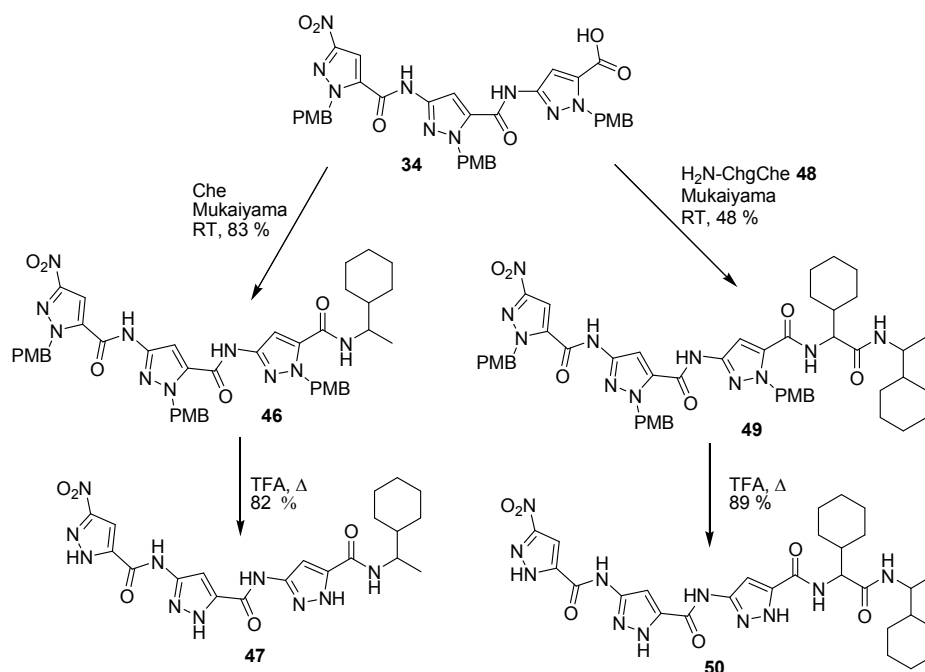
In guten Ausbeuten (63 %) konnte der Seitenketten-geschützte Lysinmethylester mit der Substanz Trimer-Säure **34** unter *Mukaiyama*-Bedingungen gekuppelt werden (**Abbildung 36**). Durch Entfernung der PMB-Schutzgruppe konnte der wasserlösliche Ligand **45** ebenfalls als Trifluoracetatsalz nahezu quantitativ isoliert werden.



**Abb. 36:** Darstellung des Liganden Trimer-Lysin **45**.

Anknüpfend an die Ergebnisse von *Kokkoni et al.*<sup>[116]</sup> sollten trimere Pyrazolbausteine mit sperrigen, lipophilen Resten funktionalisiert werden, um eine Anlagerung weiterer  $\beta$ -Faltblattstränge zu verhindern und somit die Fibrillenbildung des A $\beta$ -Peptids zu inhibieren. Verbindung **34** wurde mit einem bzw. zwei Cyclohexylresten versehen (**Abbildung 37**). Die Trimer-Säure **34** reagierte mit Cyclohexylethylamin (Che) und dem Kupplungsreagenz 2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid zu dem gewünschten Produkt **46** (83 %). Nach der Abspaltung der PMB-Schutzgruppe konnte die lipophile Verbindung **47** in einer Ausbeute

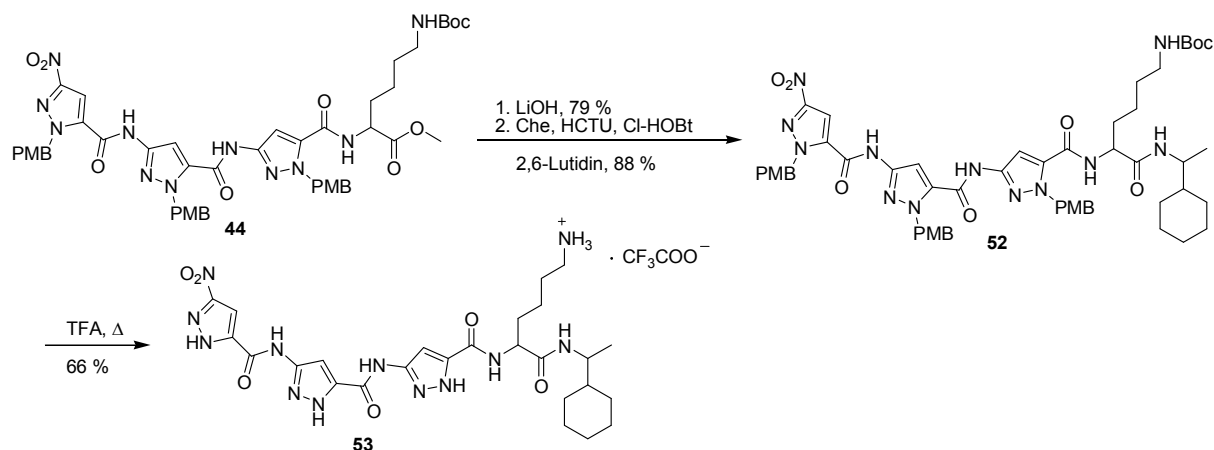
von 82 % erhalten werden. Die Umsetzung mit **34** und dem in einer zweistufigen Synthese hergestellten Amino-Cyclohexylglyciny-cyclohexylethylamin **48** ( $\text{H}_2\text{N-Chg-Che}$ ) führte in einer Ausbeute von 48 % zu dem Zielprodukt **49**. Auch hier war die saure Entschützung erfolgreich (89 %).



**Abb. 37:** Darstellung der lipophilen Liganden **47** und **50**.

Da die lipophile Verbindung **47** nur in Dimethylsulfoxid löslich war, wurde die hydrophile Aminosäure Lysin eingeführt, um die Verbindung für spätere Untersuchungen mit dem A $\beta$ -Peptid in Wasser lösen zu können. Die basische Esterspaltung der Verbindung **44** erfolgte mit Lithiumhydroxid in einer Ausbeute von 79 % (**Abbildung 38**). Im Anschluss wurde die saure Komponente **51** mit Cyclohexylethylamin, HCTU und dem Additiv Cl-HOBt umgesetzt (88 %).<sup>[160-161]</sup> Unter sauren Bedingungen konnte die Schutzgruppe entfernt und das Produkt **53** in einer 66 %igen Aubeute als Trifluoracetatsalz isoliert werden. Obwohl bei dem Liganden **45** ein Lysin ausreichte, um die Verbindung in Wasser lösen zu können, konnte dies bei **53** nicht erreicht werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der hydrophobe Anteil der Verbindung, hervorgerufen durch den Cyclohexylrest bzw. die Pyrazole, überwiegt.

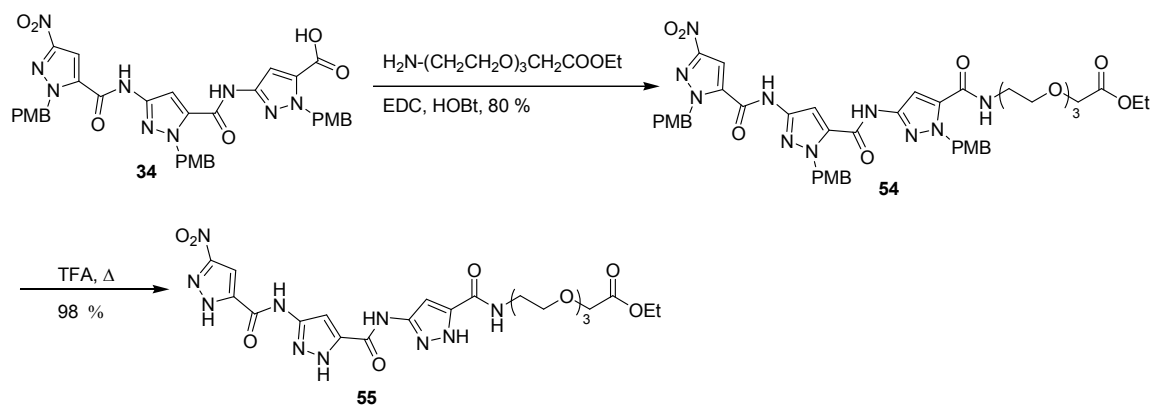




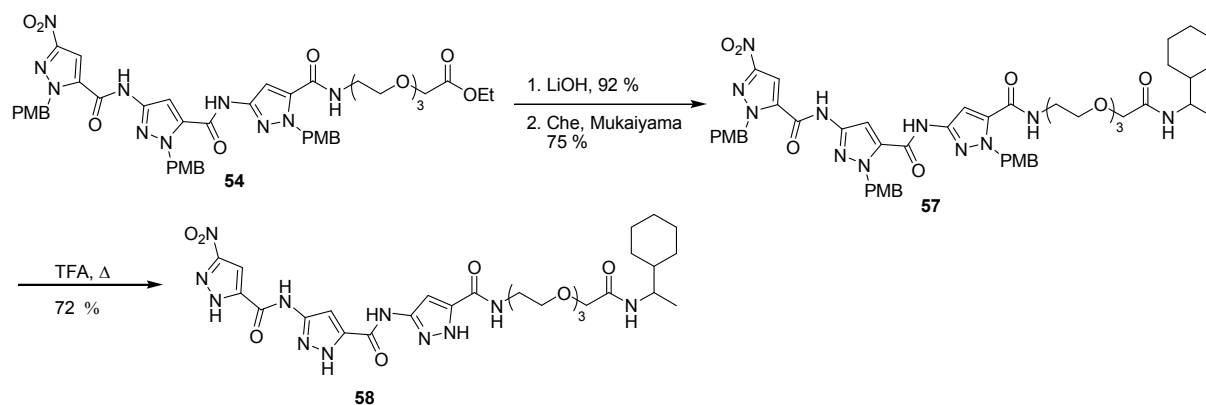
**Abb. 38:** Synthese des Liganden Trimer-Lysin-Che **53**.

Um Aufschluss über eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung von den Liganden mit dem A $\beta$ -Peptid erhalten zu können, sollten auch mehrere Substituenten in unterschiedlichem Abstand mit der trimeren Pyrazolkomponente verknüpft werden. Hierzu wurde ein löslichkeitsfördernder Triethylglykolrest (TEG) als Linker gewählt. Der Versuch die Trimer-Säure **34** mit Ethyl-2-{2-[2-(aminoethoxy)ethoxy]-ethoxy}acetat\*, dem Kupplungsreagenz HCTU und dem Additiv Cl-HOBt umzusetzen misslang. Unter *Mukaiyama*-Bedingungen konnte das gewünschte Produkt **54** nur in einer Ausbeute von 20 % erhalten werden. Eine mögliche Ursache für die unvollständige bzw. nicht erfolgte Reaktion unter *Mukaiyama*- bzw. HCTU-Bedingungen könnte die im Überschuss eingesetzte Base sein. Gegenüber der Umsetzung unter *Mukaiyama*-Bedingungen wurde bei der Kupplung mit HCTU ein größerer Überschuss an einer tertiären Base eingesetzt. Ethyl-2-{2-[2-(aminoethoxy)ethoxy]-ethoxy}acetat könnte dadurch deprotoniert worden sein und mit einem weiteren Molekül zu einem sekundären Amin reagiert sein. Erst unter der Verwendung der von *J. März-Berberich* ausgearbeiteten Synthesevorschrift mit dem Reagenz EDC und dem Zusatz von HOBt gelang die Kupplung in einer guten Ausbeute von 80 % (**Abbildung 39**). Nach der sauren Entschützung mit Trifluoressigsäure konnte der Ligand **55** nahezu quantitativ isoliert werden.

\* synthetisiert von Dr. *J. Polkowska* und *J. März-Berberich*

Abb. 39: Synthese des Liganden **55**.

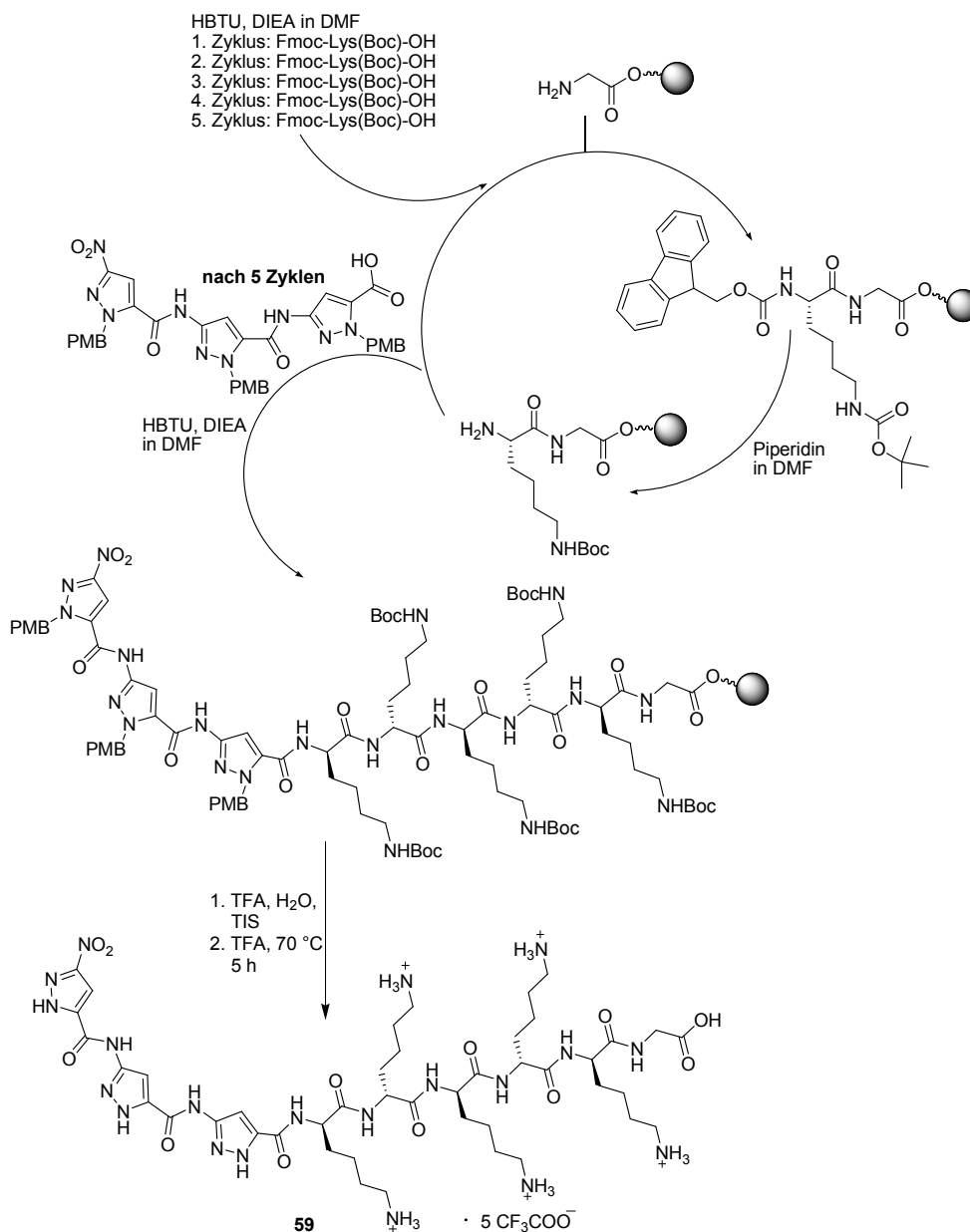
Aufgrund der in der Literatur<sup>[116]</sup> beschriebenen vielversprechenden Ergebnisse mit lipophilen Substituenten wurde auch der Ligand **55** mit einem Cyclohexylethylaminrest versehen. Die basische Esterspaltung der Verbindung **54** konnte in einer sehr guten Ausbeute (92 %) mit Lithiumhydroxid durchgeführt werden (**Abbildung 40**). Die Umsetzung der Substanz **56** mit Cyclohexylethylamin erfolgte unter *Mukaiyama*-Bedingungen mit einer Ausbeute von 75 %. Die Entfernung der PMB-Schutzgruppe gelang mit heißer Trifluoressigsäure und der über einen löslichkeitsfördernden Linker funktionalisierte, lipophile Ligand **58** konnte in 72 %iger Ausbeute erhalten werden.

Abb. 40: Darstellung des Liganden **58**.

Erstrebenswert waren ebenfalls Systeme, die auf einer Kombination der trimeren Pyrazolkomponente mit natürlichen Peptidsequenzen basieren. Die eingefügten, natürlichen Peptidsequenzen sollen zum einen über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Bindung an das Amyloid- $\beta$ -Peptid verstärken und zum anderen dem Pyrazolrezeptor eine Spezifität für das A $\beta$ -Peptid verleihen.

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, sollte durch die Verknüpfung des Trimers mit Polykationen die Glutamat-Leiter einer pentameren Protofibrille stabilisiert und somit die Anlagerung einer weiteren Protofibrille verhindert werden. In Anlehnung an die Resultate von *Murphy*<sup>[100]</sup>, der Tetralysine mit der KLVFF-Sequenz verknüpfte und in Zelltests eine signifikante Neuroprotektion gegen die A $\beta$ -Toxizität erreichte, wurden ebenfalls Lysine als Polykationen eingesetzt.

Das Pentalysin wurde mittels manueller Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie, die von *J. März-Berberich* ausgearbeitet wurde, an einem mit Glycin vorbeladenen *Wang*-Harz aufgebaut.<sup>[162]</sup> Die Kupplung der kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren erfolgte mit dem Kupplungsreagenz HBTU in DMF. Die Fmoc-Schutzgruppen wurden mit Piperidin, gelöst in DMF, abgespalten. Die Vollständigkeit der einzelnen Kupplungsschritte wurde sowohl mit dem Kaiser-<sup>[163]</sup> als auch mit dem Nf31-Test<sup>[164]</sup> kontrolliert. Bei unvollständiger Umsetzung wurde der Kupplungszyklus wiederholt. Die Synthese erfolgte nach folgendem Reaktionsschema (**Abbildung 41**):



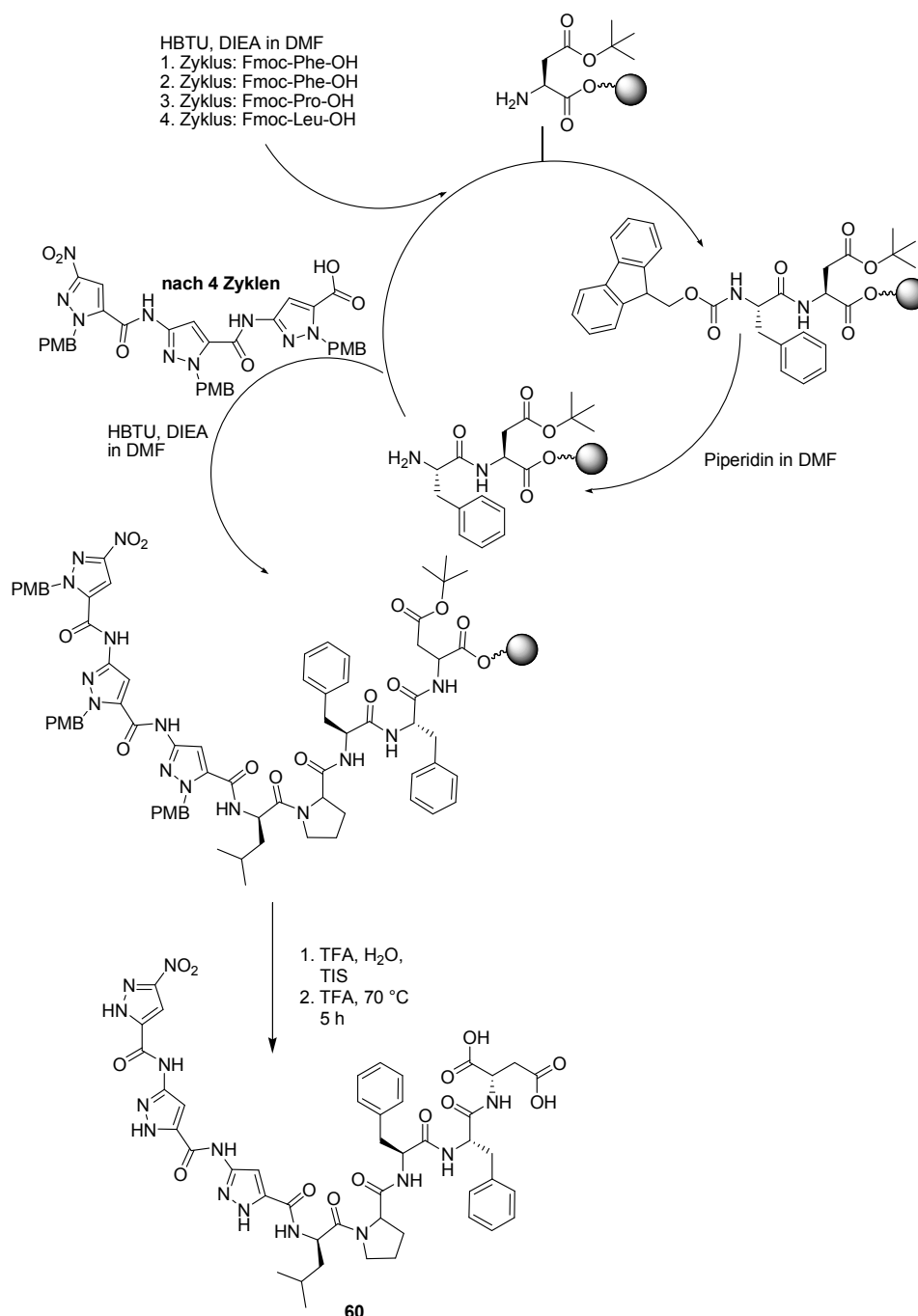
**Abb. 41:** Reaktionsschema der Festphasensynthese des Liganden **59**.

Nach fünf Kupplungszyklen wurden zur Kontrolle, ob das gewünschte Hexapeptid auf dem polymeren Träger immobilisiert vorlag, einige getrocknete Polymerkugeln für drei Stunden in einem „Cleavage-Cocktail“ aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2 %) vom Harz abgespalten. Die Lösung wurde filtriert, das Peptid aus Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Das gewünschte Produkt konnte mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde zu den Polymerkugeln die PMB-geschützte Trimer-Säure **34** hinzugegeben, die ebenfalls mit HBTU in DMF gekuppelt wurde. Die geschützte Verbindung wurde in einer Mischung aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (TIS, 5 %) und

Wasser (2 %) vom Harz abgespalten, wobei gleichzeitig die Boc-Schutzgruppen und zum Teil auch die PMB-Schutzgruppen entfernt wurden. Mit Trifluoressigsäure bei 70 °C konnte die vollständig entschützte Verbindung **59** erhalten werden. Der neue Ligand Trimer-KKKKKKG **59** konnte in einer Reinheit von 98 % synthetisiert werden.

Die von *Soto et al.*<sup>[113]</sup> rational entworfene Sequenz LPFFD sollte als eine weitere erfolgversprechende Peptidsequenz eingeführt werden. Das Peptid agiert als  $\beta$ -sheet-breaker und bewirkte *in vitro* die Auflösung von bereits bestehenden Fibrillen. Durch die Verknüpfung der trimeren Pyrazolkomponente mit dem Peptid LPFFD sollte die Funktion als  $\beta$ -sheet-breaker signifikant verstärkt werden können. Sowohl inhibierende als auch disaggregierende Effekte sollten mit A $\beta$  zu sehen sein. Die Sequenz LPFFD wurde mittels manueller Fmoc-Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Als polymerer Träger wurde ein mit Asparaginsäure (D) vorbeladenes *Wang*-Harz und als Kupplungsreagenz HBTU in DMF verwendet. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte mit Piperidin, das in DMF gelöst war. Mit Hilfe des Kaiser-, Nf31- und Chloranil-Tests wurden die einzelnen Kupplungsschritte auf ihre Vollständigkeit hin geprüft.<sup>[162]</sup> Letzterer wurde bei der Kupplung mit der Fmoc-geschützten Aminosäure Prolin verwendet. Nach dem vierten Syntheszyklus wurde mittels Massenspektrometrie überprüft, ob das Pentapeptid immobilisiert auf dem polymeren Träger vorlag. Anschließend folgte die Kupplung des Pyrazolbausteins **34**. Mit einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser im Verhältnis 93:5:2, erfolgte die Abspaltung vom Harz. Der Ligand **60** konnte in einer finalen Entschützung mit Trifluoressigsäure isoliert werden. **Abbildung 42** stellt das Syntheschema dar.



**Abb. 42:** Darstellung der Fmoc-Festphasensynthese von Ligand **60**.

Unter der Berücksichtigung, dass KLVFF sich selbst erkennt,<sup>[98,99]</sup> sollte der Zugang zu einem neuen, effizienten Liganden, der eine Spezifität für A $\beta$  zeigt, möglich sein.

Die Seitenketten- und C-terminal geschützte Sequenz H-KLVFF-OMe konnte zunächst problemlos mittels Lösungssynthese erhalten werden.<sup>[84]</sup> Die Umsetzung der Trimer-Säure **34** mit dem Pentapeptid KLVFF unter verschiedenen Kupplungsbedingungen (PyClop, *Mukaiyama*-Reagenz, HCTU/Cl-HOBt) blieb jedoch erfolglos. Bereits während der Reaktionen bildete sich ein Feststoff, der nicht mehr löslich war. Da bekannt ist, dass das

KLVFF-Peptid selbst Fibrillen bildet<sup>[165]</sup>, könnte es hier zu einer Aggregat- oder Fibrillenbildung gekommen sein. Dieser Zusammenschluss des Pentapeptids könnte eine Erklärung für diesen unlöslichen Feststoff sein.

Die KLVFF-Sequenz konnte sowohl mittels automatisierter Festphasensynthese mit einem Mikrowellen-Peptidsynthesizer Liberty (CEM GmbH, Kamp-Lintfort) als auch mittels manueller Festphasensynthese dargestellt werden. Liganden bzw. Peptide sind durch die Immobilisierung an ein Polymer in den entsprechenden Lösungsmitteln besser löslich, es kann zu keiner Zusammenlagerung einzelner Moleküle kommen.

Die Synthese des Pentapeptids KLVFF erfolgte nach einem Syntheseprotokoll von *J. März-Berberich*.<sup>[162]</sup> Als polymerer Träger diente ein *Wang*-Harz, das mit Phenylalanin vorbeladen war. Die Kupplung der kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren wurde jeweils mit dem Kupplungsreagenz HBTU in DMF durchgeführt. Die Schutzgruppen wurden auch hier mit Piperidin abgespalten. Nach den vier Synthesesyklen wurde das Harz gründlich gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Zur Überprüfung, ob das gewünschte Produkt auf dem polymeren Träger immobilisiert vorlag, wurden einige getrocknete Polymerkugeln für drei Stunden in einer Mischung aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2 %) vom Harz abgespalten. Die Lösung wurde filtriert und das Produkt aus Diethylether ausgefällt. Nach anschließender Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid mittels analytischer HPLC und Massenspektrometrie untersucht. Die Sequenz KLVFF konnte analysenrein synthetisiert werden. Nachfolgende Kupplung der Timer-Säure **34** mit dem festphasengebundenen Pentapeptid wurde manuell mit HBTU, gelöst in DMF, durchgeführt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte wie bereits beschrieben mit TFA, TIS und Wasser. Durch anschließende PMB-Entschützung mit Trifluoressigsäure bei 70 °C konnte der Ligand **61** erhalten werden. In **Abbildung 43** sind die Synthesesyklen gezeigt.

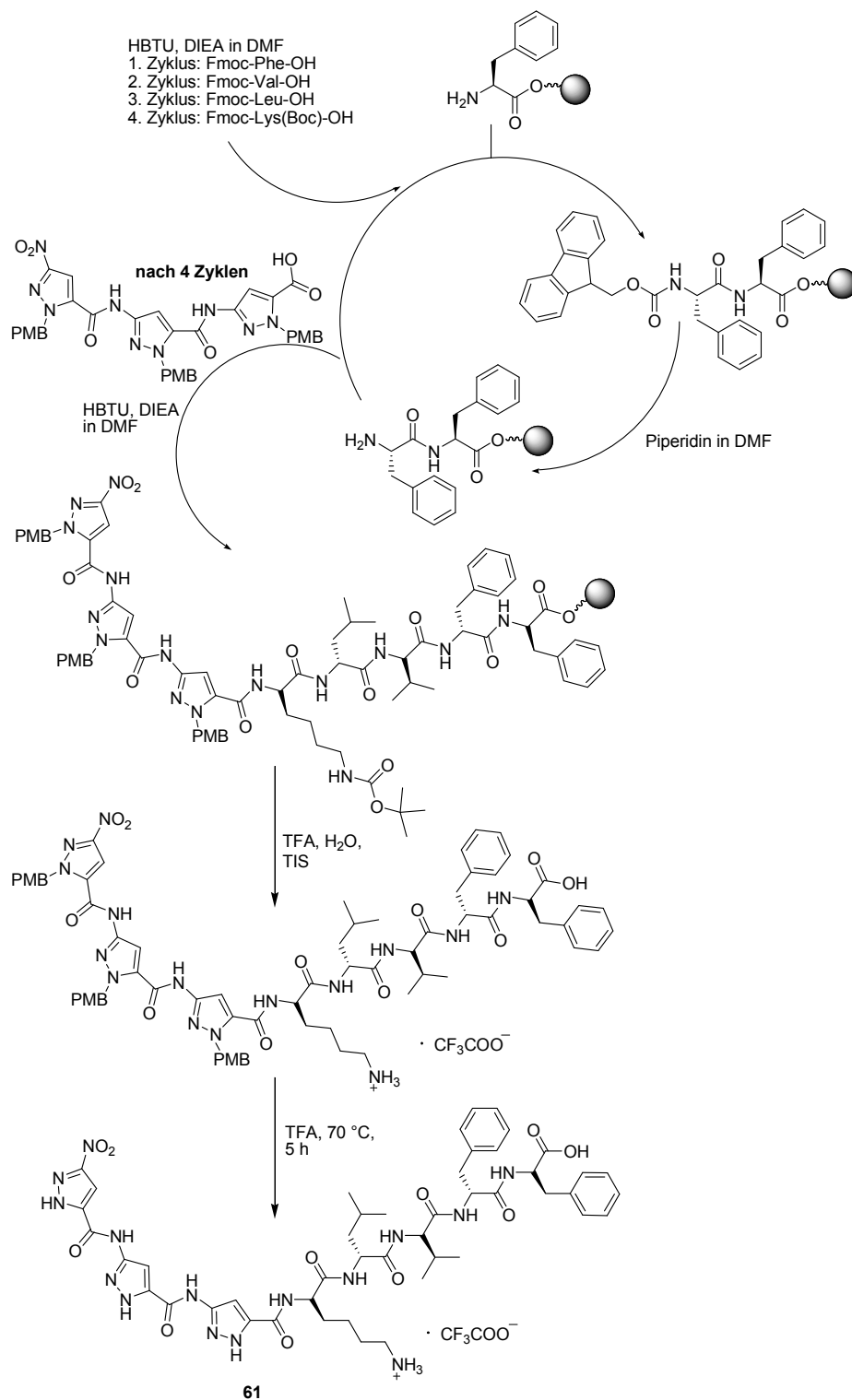


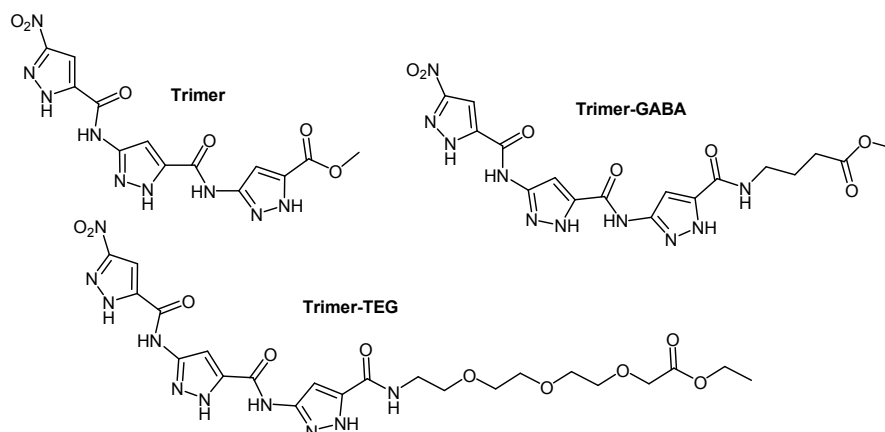
Abb. 43: Syntheseyklus zur Darstellung des Rezeptors 61.



### 3.2.1 Überblick der neuen Liganden

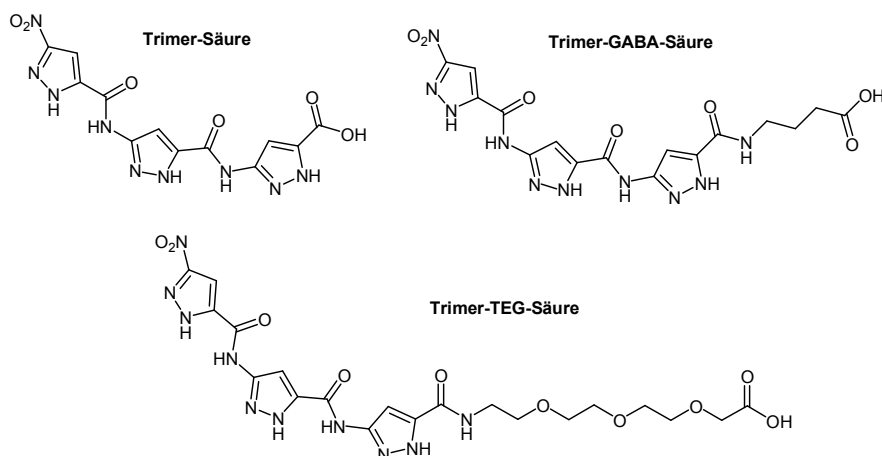
Es konnte erfolgreich eine Vielfalt von Liganden synthetisiert werden, die sich sowohl in ihrer Länge und Größe als auch in ihrer Funktionalität unterscheiden. Nachfolgend sind alle Liganden, unterteilt in funktionelle Gruppen, dargestellt.

**Abbildung 44** zeigt die Liganden, welche einen Carbonsäureester als funktionelle Gruppe aufweisen und dieser unterschiedlich weit von den Pyrazoleinheiten entfernt ist.



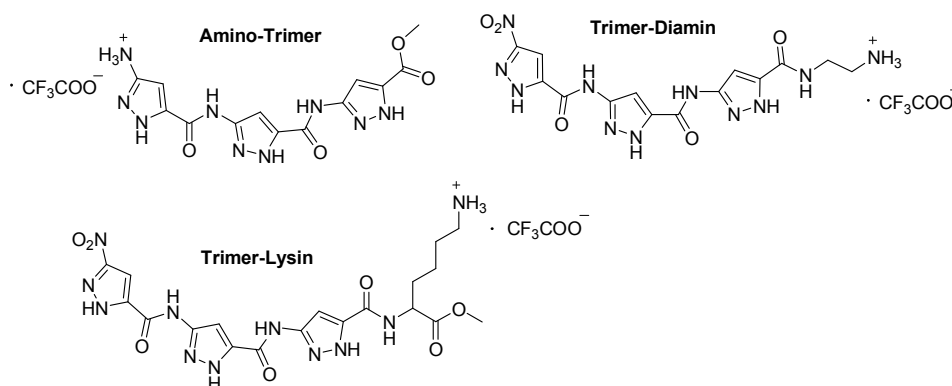
**Abb. 44:** Strukturen der Liganden Trimer **21**, Trimer-GABA **38** und Trimer-TEG **55**.

Durch basische Esterpaltungen konnten die in **Abbildung 44** aufgeführten Liganden zu den entsprechenden Carbonsäuren Trimer-Säure **36**, Trimer-GABA-Säure **40** und Trimer-TEG-Säure **62** (synthetisiert von *J. März-Berberich*) umgesetzt werden (**Abbildung 45**).



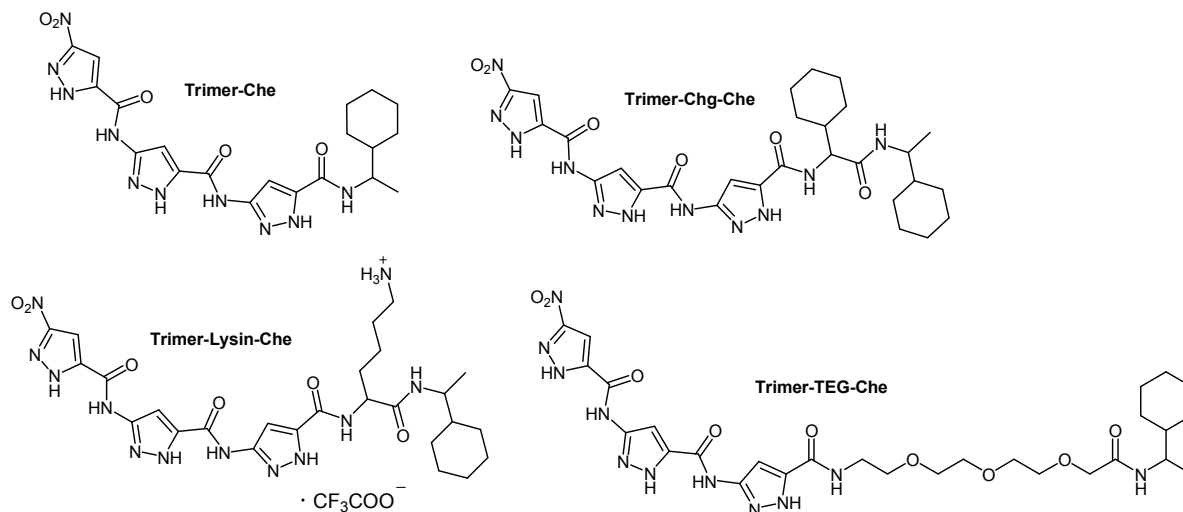
**Abb. 45:** Strukturen der Liganden Trimer-Säure **36**, Trimer-GABA-Säure **40** und Trimer-TEG-Säure **62**.

Basische Funktionalitäten besitzen die Liganden Amino-Trimer **35**, Trimer-Diamin **43** und Trimer-Lysin **45** (**Abbildung 46**), wobei die Ammoniumgruppe unterschiedlich weit von den Pyrazoleinheiten entfernt ist.



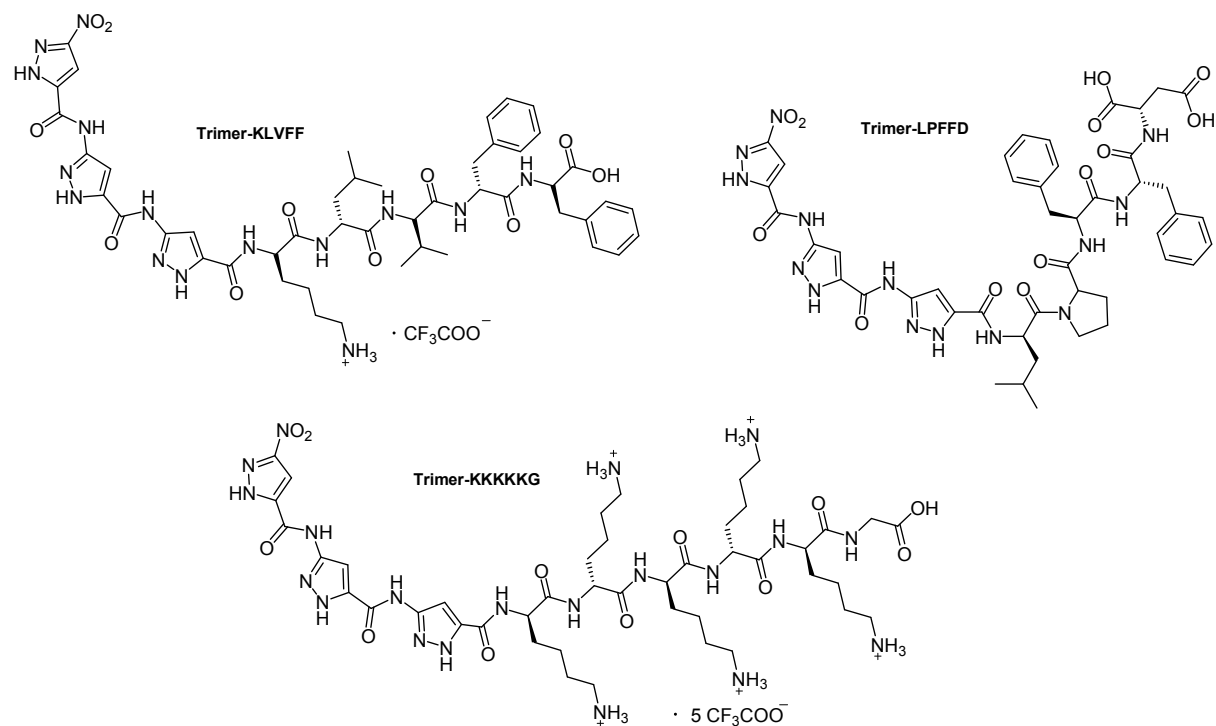
**Abb. 46:** Strukturen der Liganden Amino-Trimer **35**, Trimer-Diamin **43**, Trimer-Lysin **45**.

In **Abbildung 47** sind die lipophilen Verbindungen gezeigt, bei denen der Ligand Trimer **21** zum einen direkt mit einem (Trimer-Che **47**) bzw. mit zwei Cyclohexylringen (Trimer-Chg-Che **50**) und zum anderen über einen Abstandshalter mit einem Cyclohexylring (Trimer-Lysin-Che **52**, Trimer-TEG-Che **58**) verknüpft wurde.



**Abb. 47:** Strukturen der Liganden Trimer-Che **47**, Trimer-Chg-Che **50**, Trimer-Lysin-Che **52** und Trimer-TEG-Che **58**.

Nachstehend sind die Liganden abgebildet, bei der die Leitstruktur Trimer **21** mit unterschiedlichen Peptidsequenzen (Trimer-KLVFF **61**, Trimer-LPFFD **60** und Trimer-KKKKKG **59**) kombiniert wurde (**Abbildung 48**).



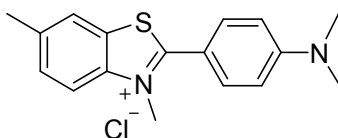
**Abb. 48:** Strukturen der Liganden Trimer-KLVFF **61**, Trimer-LPFFD **60** und Trimer-KKKKKG **59**.

### 3.3 Untersuchungen mit A $\beta$ (1-40) bzw. A $\beta$ (1-42)

Die oben beschriebenen rational entworfenen  $\beta$ -Faltblattliganden wurden auf ihre Wechselwirkungen mit dem A $\beta$ -Peptid (A $\beta$ (1-40) bzw. A $\beta$ (1-42)) untersucht. Ziel war es, die Fähigkeit als  $\beta$ -Faltblattbrecher und somit den hemmenden bzw. auflösenden Effekt auf die Agglomeration von A $\beta$  zu testen. Hierzu wurden verschiedene *in vitro* Methoden verwendet. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Willbold* wurden einige der synthetisieren Liganden mit Hilfe von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und analytischer Ultrazentrifugation genauer untersucht. Die Aufnahmen eines Liganden mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden in einer Zusammenarbeit mit *Meyer-Zaika* (AK *Eppe*) angefertigt. Die Proben für diese Messungen wurden von *Nagel-Steger* (AK *Willbold*) vorbereitet.

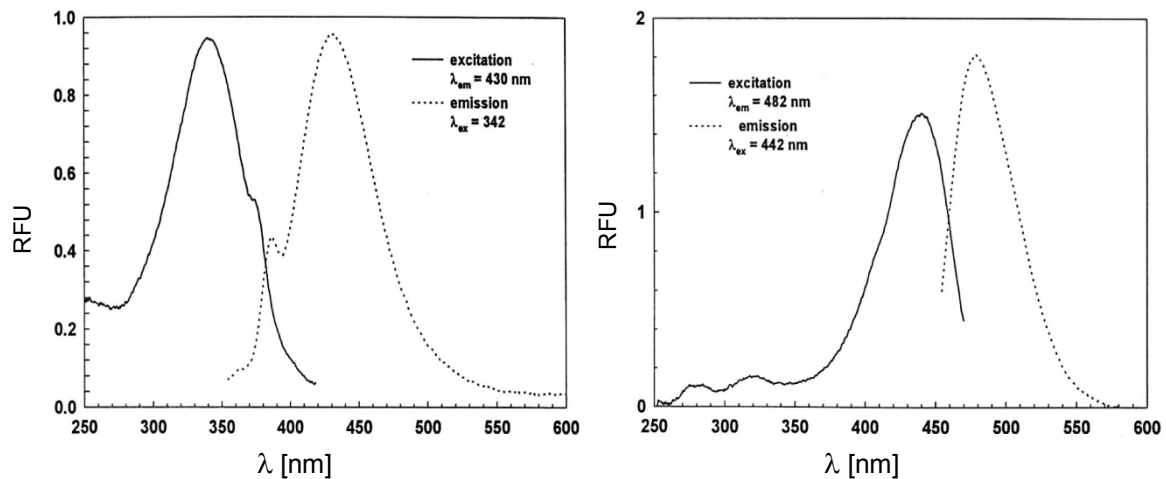
#### 3.3.1 Thioflavin T Messungen

Thioflavin T **63** (ThT), 3,6-Dimethyl-2-(4-dimethylaminophenyl)-benzothiazoliumchlorid (**Abbildung 49**), ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der anfänglich in der Histologie eingesetzt wurde. Er führt durch Interaktion mit einer Reihe von Gewebekomponenten zu spezifischen Färbemustern und kann somit Strukturen von beispielsweise Mucopolysacchariden, Nucleinsäuren und amyloide Fibrillen visualisieren.<sup>[166-168]</sup>



**Abb. 49:** Struktur von Thioflavin T **63** (ThT).

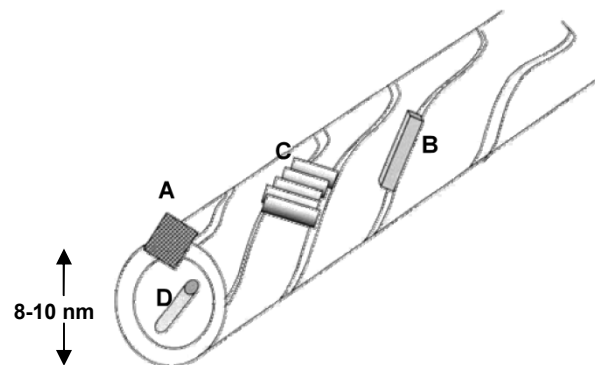
ThT bindet an amyloide Proteinstrukturen und erfährt dadurch eine charakteristische Änderung seines Fluoreszenzspektrums. Diese Änderung zeichnet sich durch eine batho- und hyperchrome Verschiebung der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber des freien Farbstoffes aus (**Abbildung 50**).



**Abb. 50:** Fluoreszenzspektren von freiem ThT (links) und an Aβ(1-42) gebundenes ThT (rechts).<sup>[145]</sup>

Im Thioflavin T-Test wird die Excitationswellenlänge so gewählt, dass nur gebundenes ThT angeregt wird. Das erhaltene Emissionsspektrum kann Auskunft über die Menge des komplexierten Farbstoffes geben. Existieren in der untersuchten Lösung viele amyloide Fibrillen, so kann viel ThT an diese binden, was zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt. Befinden sich wenige Fibrillen in Lösung, so ist die Fluoreszenzintensität niedrig. Somit können mit Hilfe dieses Fluoreszenzfarbstoffes amyloide Strukturen quantifiziert werden.<sup>[145]</sup>

Mittels Wettbewerbsversuche mit radioaktiv markierten Liganden konnte *LeVine*<sup>[169]</sup> feststellen, dass das Amyloid β diverse Bindungsdomänen für die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe besitzen muss. Die Komponenten, die Amyloid β komplexieren, können entweder an unterschiedlichen Fibrillen binden, oder an der gleichen Fibrille, allerdings an verschiedenen Stellen, wie beispielsweise zwischen einzelnen β-Faltblättern oder im Kern der Fibrille (**Abbildung 51**).

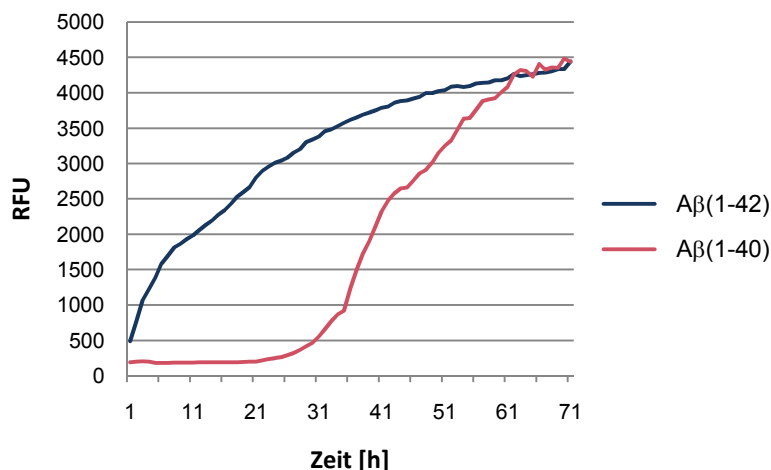


**Abb. 51:** Denkbare Bindungsstellen für Liganden an amyloide Fibrillen. A: an den Enden der Fibrille bzw. Protofibrille, B: zwischen den Protofibrillen, C: zwischen einzelnen β-Faltblättern und D: im Kern der Fibrille.<sup>[169]</sup>

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThT können spezifisch amyloide Fibrillen von amorphen A $\beta$ -Aggregaten und nicht amyloiden Fibrillen des Amyloid Precursor Proteins unterschieden werden.<sup>[145]</sup> ThT erfährt nur dann seine charakteristische Fluoreszenzverschiebung, wenn es an amyloide Fibrillen gebunden vorliegt. Bei Komplexierung des ThT an Monomere, kleine Oligomere oder amorphe Aggregate des A $\beta$ -Peptids erfolgt keine spektrale Verschiebung. Die Interaktion des Fluoreszenzfarbstoffs ThT mit amyloiden Fibrillen basiert auf der  $\beta$ -Faltblattstruktur der Fibrillen.<sup>[170]</sup> Folglich kann ThT auch an Protofibrillen und größere Oligomere binden, wenn deren Sekundärstruktur vorwiegend  $\beta$ -Faltblattkonformation aufweist.

### 3.3.1.1 Aggregation der Peptide A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42)

Die synthetisierten Liganden sollten mit Hilfe des Thioflavin T-Tests auf ihre aggregationsinhibierende und disaggregierende Wirkung bezüglich des Amyloid  $\beta$ -Peptids (A $\beta$ (1-40) bzw. A $\beta$ (1-42)) untersucht werden. Vor allem für die aggregationsinhibierenden Messungen ist es wichtig, dass monomeres A $\beta$  benutzt wird. Hierzu wurde bei A $\beta$ (1-40) das gekaufte Lyophilisat von der Firma *Bachem* in DMSO gelöst, da laut Literatur<sup>[171]</sup> durch die Zugabe von absolutem DMSO das A $\beta$ -Peptid fast ausschließlich als Monomer vorliegt und keinen detektierbaren Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzt.<sup>[152]</sup> Problematisch war es, das ebenfalls von *Bachem* gekaufte A $\beta$ (1-42) vollständig in DMSO zu lösen. In den ersten kinetischen Untersuchungen mit A $\beta$ (1-42) konnte selbst nach 24 Stunden nicht der zu erwartende Fluoreszenzanstieg, sondern nur eine konstante Linie bei einer hohen Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass bereits fibrilläre Aggregate vorlagen. Daraufhin wurde das Peptid erst in Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöst, wodurch bereits bestehende Aggregate aufgelöst werden sollten.<sup>[145,172]</sup> Anschließend wurde es lyophilisiert und dann in DMSO gelöst. Durch diese Vorgehensweise sollte gewährleistet werden, dass zu Beginn der Aggregation nahezu ausschließlich monomeres A $\beta$  vorliegt. Um dies zu überprüfen, wurde der zeitliche Verlauf der Aggregation beider Peptide untersucht (**Abbildung 52**). Die Anfangsstadien der Aggregation unterscheiden sich bei beiden Peptiden deutlich voneinander.



**Abb. 52:** Kinetik der Aβ(1-40) bzw. Aβ(1-42) Aggregation. Die Aggregationsansätze hatten eine Endkonzentration von 10 μM ThT und 33 μM Aβ in 1 x PBS. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einer Excitationswellenlänge von 446 nm<sup>[173]</sup> und einer Emissionswellenlänge von 490 nm<sup>[173]</sup> durchgeführt.

Aβ(1-42) aggregiert sehr schnell und bildet demnach schneller Fibrillen als Aβ(1-40).<sup>[174,175]</sup> Nach 72 Stunden haben beide Peptide ein Plateau erreicht, wobei die Messwerte oberhalb von 72 Stunden einen annähernd konstanten Wert zeigen. Im Gegensatz zu dem Aggregationsverlauf von Aβ(1-42), bei dem von Anfang an ein stetiger Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheit (relative fluorescence unit, RFU) zu sehen ist, wird bei Aβ(1-40) die sogenannte „lag-phase“, ein Zeitraum, in dem sich die Aggregationskeime bilden, und die „growth-phase“ beobachtet.<sup>[176]</sup> Auf Grund dieser Beobachtungen wurden Inhibierungsansätze mit den zu untersuchenden Liganden über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt.

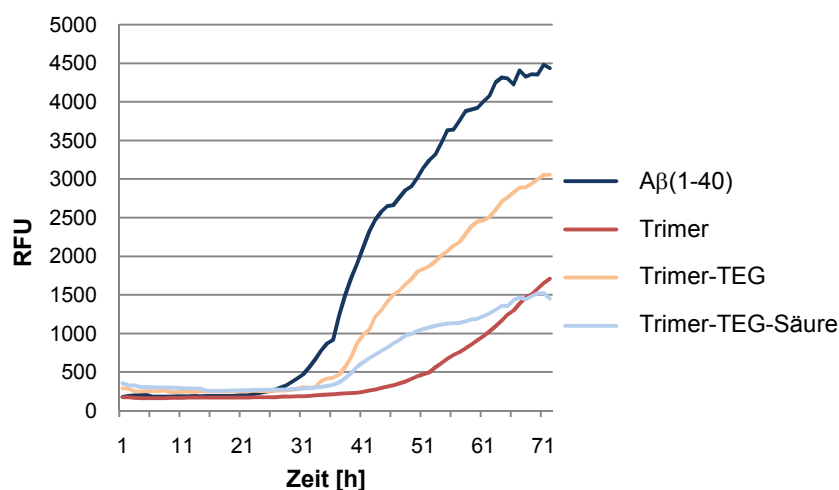
### 3.3.1.2 Einfluss der synthetisierten Liganden auf das Aggregationsverhalten des Aβ(1-40)-Peptids

Vorab wurden die Substanzen auf ihre Eigenfluoreszenz und auf mögliche Wechselwirkungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThT untersucht. Keine der synthetisierten Verbindungen zeigte Eigenfluoreszenz oder Wechselwirkungen mit ThT, so dass alle Verbindungen mit dieser Methode getestet werden konnten.

Zu den Aggregationsansätzen, die alle eine Endkonzentration von 33 μM Aβ(1-40) bzw. Aβ(1-42) in 1 x PBS (phosphate buffered saline) hatten, wurden sechs Äquivalente des jeweiligen Liganden zugegeben. Unter dem Kontrollansatz wird ein 33 μM

A $\beta$ -Aggregationsansatz verstanden, der ohne Liganden durchgeführt wird. Diesem Kontrollansatz wurde immer die entsprechende Menge Lösungsmittel des zu testenden Liganden hinzugefügt, um mögliche Lösungsmittelleffekte auszuschließen.

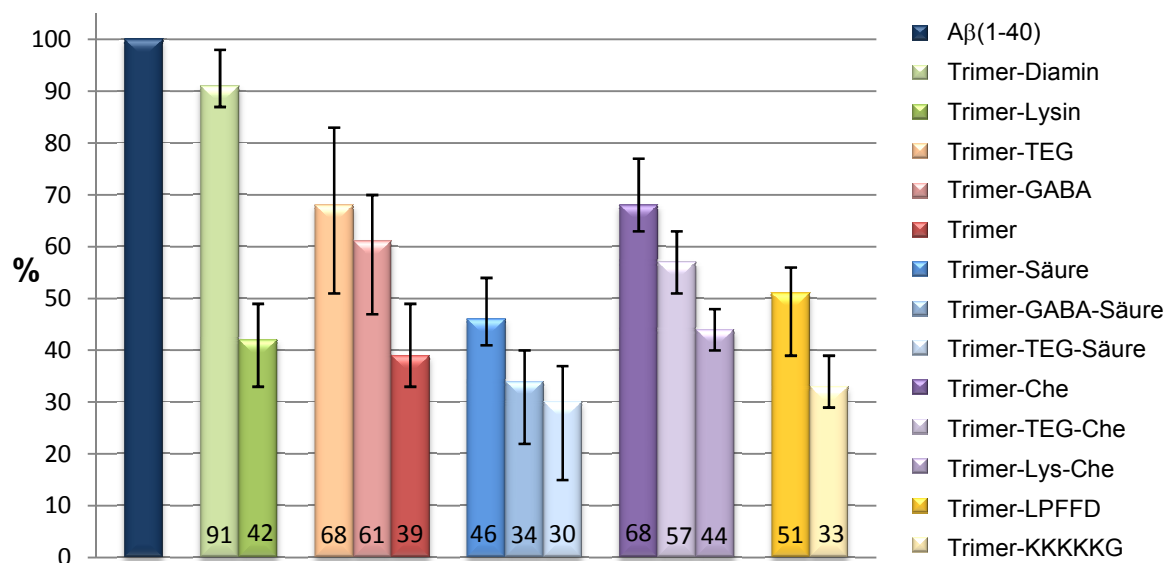
Zuerst wurden die Liganden mit A $\beta$ (1-40) untersucht. Exemplarisch sind in **Abbildung 53** einige Aggregationskurven der zu testenden Liganden gezeigt. In allen vier Kurvenverläufen ist die „lag-phase“ zu erkennen, die in dem Kontrollansatz bereits nach etwa 24 Stunden in die „growth-phase“ übergeht. Durch die Zugabe der Liganden konnte eine Verlängerung der „lag-phase“ festgestellt werden. Mit dem Zusatz der Trimer-TEG-Säure **62** konnte die Bildung der Aggregationskeime um etwa 16 Stunden am längsten hinaus verzögert werden. Alle drei Liganden weisen eine niedrigere Fluoreszenzintensität als der Kontrollansatz auf. Demnach zeigen alle Liganden einen inhibierenden Effekt auf die Aggregation des A $\beta$ (1-40)-Peptids.



**Abb. 53:** Kinetik der A $\beta$ (1-40)-Aggregation in Gegenwart von Trimer **21**, Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62**. Die blaue Kurve stellt den Aggregationsverlauf ohne Ligandenzugabe dar.

Durch den Zusatz von einem sechsfachen Überschuss des jeweiligen Liganden konnte bei Trimer-TEG **55** ein um 32 % reduziertes Thioflavin T-Signal, bei Trimer **21** ein um 61 % reduziertes und bei Trimer-TEG-Säure **62** ein um 70 % geringeres Signal gemessen werden. Trimer-TEG-Säure **62** zeigt auf die Aggregation des A $\beta$ (1-40) den stärksten inhibierenden Effekt, wie in **Abbildung 54** nochmals verdeutlicht wird.





**Abb. 54:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die Aβ(1-40)-Aggregation. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

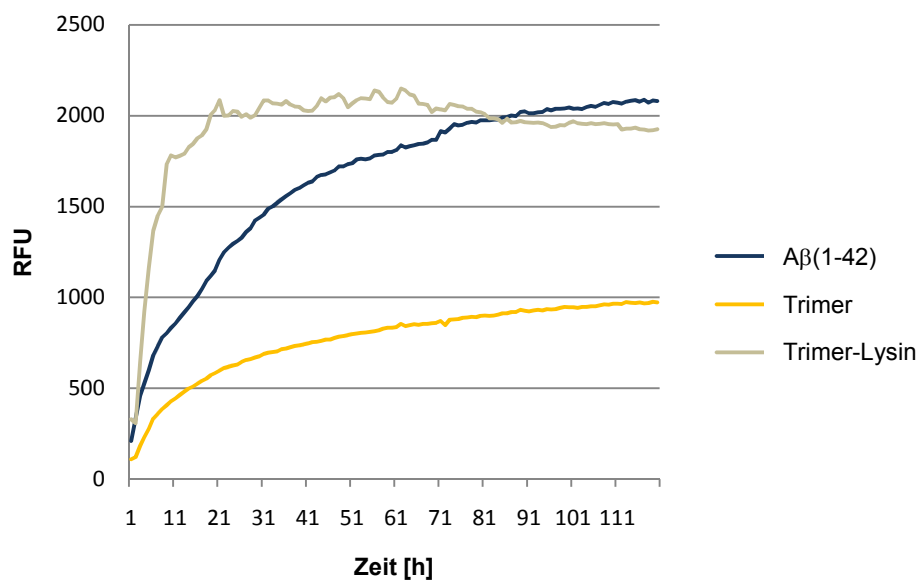
In dieser **Abbildung 54** sind alle Liganden aufgeführt, deren Einfluss auf die Aβ(1-40)-Aggregation untersucht wurde. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben. Alle Ansätze wurden für 72 Stunden inhibiert. Die Endkonzentrationen betrugen 33 μM Aβ(1-40), 10 μM ThT und 200 μM des jeweiligen Liganden.

Der Einfluss der Liganden ist sehr unterschiedlich. Auffallend ist, dass die Liganden, die in ihrer Struktur eine Carbonsäure aufweisen, starke bis sehr starke Effekte zeigen. Dabei war die Wirkung der Verbindungen umso besser, je mehr C-Atome zwischen der Carbonsäure und dem Grundgerüst Trimer liegen (Trimer-TEG-Säure **62** > Trimer-GABA-Säure **40** > Trimer-Säure **36**). Bei den Verbindungen mit einem Carbonsäureester als funktionelle Gruppe scheint der Effekt umgekehrt zu sein. Hier ist der Ligand Trimer **21** der potenteste, danach Trimer-GABA **38** und mit einer Reduzierung des Fluoreszenzsignals um 32 % zeigte Trimer-TEG **55** den schwächsten Einfluss.

Die basischen Liganden zeigten sehr unterschiedliche Wirkungen. Trimer-Diamin **43** besaß nahezu keinen Effekt, wohingegen Trimer-Lysin **45** die Fluoreszenzintensität um 58 % senken konnte. Trimer-KKKKKKG **59** konnte am stärksten die Fibrillenbildung hemmen. Die lipophilen Liganden wiesen einen moderaten Einfluss auf die Aβ-Aggregation auf.

### 3.3.1.3 Einfluss der synthetisierten Liganden auf das Aggregationsverhalten des A $\beta$ (1-42)-Peptids

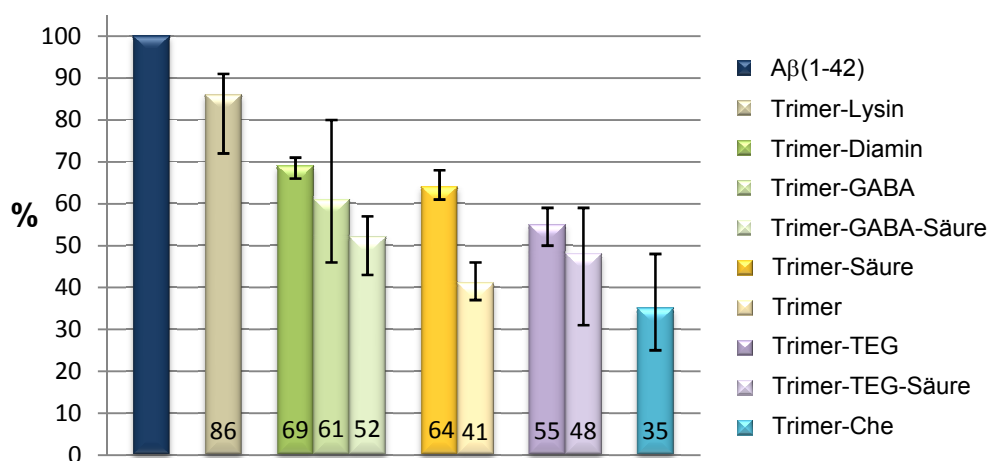
Die inhibierenden Wirkungen der Liganden sollten nun auch mit dem sehr viel schneller aggregierendem A $\beta$ (1-42) überprüft werden. Hierzu wurden die Liganden ebenfalls im sechsfachen Überschuss zu den Aggregationsansätzen gegeben. Es wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen inhibiert. Die **Abbildung 55** zeigt den Verlauf einiger untersuchter Liganden.



**Abb. 55:** Kinetik der A $\beta$ (1-42)-Aggregation in Gegenwart von Trimer **21** und Trimer-Lysin **45**. Die blaue Kurve stellt den Aggregationsverlauf der Kontrolle dar.

Der blaue Kurvenverlauf stellt den Kontrollansatz dar. Der Aggregationsverlauf des Trimers **21** besitzt eine ähnliche Kurvenform wie der Kontrollansatz, jedoch beginnt die Aggregation mit einem niedrigeren Fluoreszenzsignal und verläuft sehr viel flacher als die Aggregation der Kontrolle. Mit der Zugabe des Trimers **21** konnte die Fluoreszenzintensität um 59 % gesenkt werden. Werden sechs Äquivalente Trimer-Lysin **45** zu dem Aggregationsansatz gegeben, so kann eine hohe Fluoreszenzintensität beobachtet werden, welche die des Kontrollansatzes leicht übertrifft. Außerdem ist ein sehr steiler Anstieg der Kurve zu erkennen. Da das ThT-Signal Auskunft über die Menge an amyloiden Strukturen gibt, kann davon ausgegangen werden, dass mit Trimer-Lysin **45** die Fibrillenbildung stark beschleunigt wird.

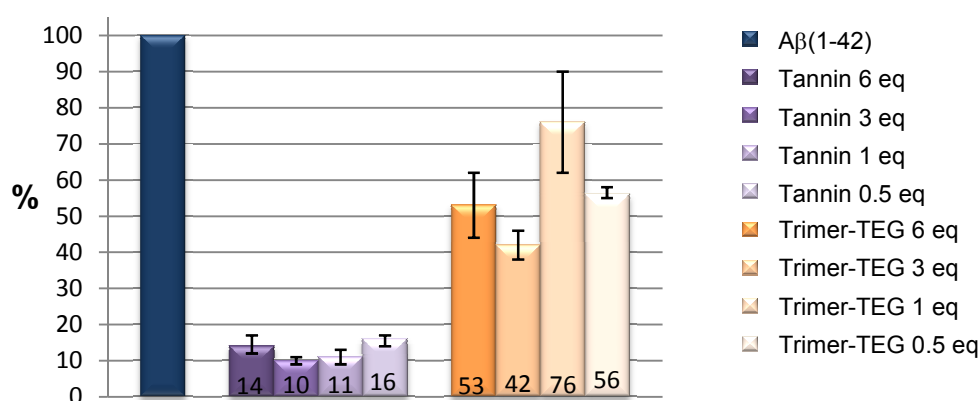
Einige Liganden, die mit A $\beta$ (1-42) untersucht wurden, sind in **Abbildung 56** gezeigt. Die Resultate sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %). Die Ansätze wurden über einen Zeitraum von 120 Stunden inhibiert. Die Endkonzentrationen lagen bei 33  $\mu$ M A $\beta$ (1-42), 10  $\mu$ M ThT und 200  $\mu$ M des jeweiligen Liganden. Wie bei den Untersuchungen mit dem A $\beta$ (1-40) zeigten auch hier alle synthetisierten Verbindungen einen inhibierenden Effekt, wobei viele der Liganden keinen nennenswerten Einfluss auf die Aggregation haben. Bei diesen Liganden konnte das ThT-Signal um Werte zwischen 31 % und 48 % verringert werden. Hervorzuheben ist Trimer-Lysin **45**, welches die Intensität lediglich um 14 % reduzieren konnte. Den stärksten Einfluss erzielte der Ligand Trimer-Che **47** auf die A $\beta$ (1-42)-Aggregation.



**Abb. 56:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die Aggregation des A $\beta$ (1-42)-Peptids. Die Resultate sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %).

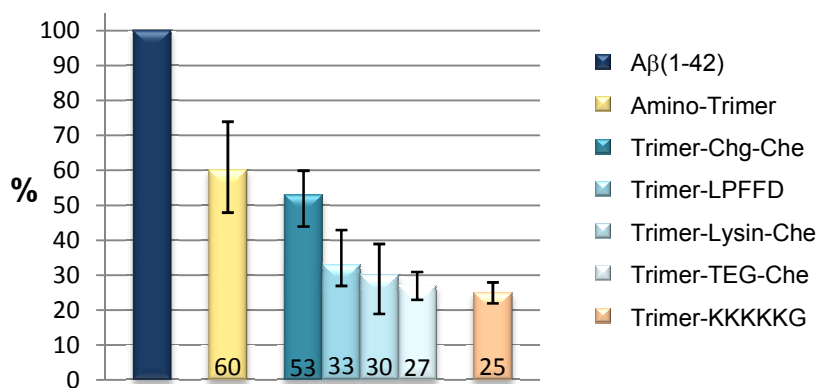
Trimer-TEG **55** wies einen moderaten Effekt auf und sollte mit einer Substanz verglichen werden, die nach Yang *et al.*<sup>[177]</sup> eine sehr starke aggregationshemmende Wirkung bei niedrigen Konzentrationen zeigte. Diese Forschungsgruppe entwickelte einen Assay mit monoklonalen A $\beta$ -Antikörpern (IgG), der es ihnen erlaubte, schnell viele Substanzen auf ihre Eigenschaften die Interaktion mit den Antikörpern zu inhibieren, zu untersuchen. Als potenteste Substanz zeigte sich Tannin **9** (Substanzklasse der Polyphenole) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.39  $\mu$ M. Diese Verbindung wies stärkere Effekte als Ibuprofen<sup>[169]</sup> auf, welches als Medikament zur Behandlung der AD eingesetzt wird. Die Substanzen (Trimer-TEG **55** und Tannin **9**) sollten nun in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Aggregationsansätzen hinzugegeben werden, um die jeweiligen Wirkungen miteinander vergleichen zu können. In **Abbildung 57** sind die Ergebnisse der getesteten Verbindungen dargestellt. Der blaue Balken

zeigt die Fluoreszenzintensität des Kontrollansatzes. Wird der Ligand Tannin **9** (lilafarbene Balken) betrachtet, so ist zu erkennen, dass die Wirkung auf die Fibrillenbildung konzentrationsunabhängig zu sein scheint. Die Fluoreszenzintensität konnte um 84-90 % minimiert werden. Trimer-TEG **55** dagegen zeigte eine konzentrationsabhängige Wirkung. Mit einem dreifachen Überschuss des Liganden konnte die beste inhibierende Wirkung erlangt werden. Der Ligand Trimer-TEG **55** besitzt eindeutig einen schwächeren Einfluss auf die A $\beta$ -Aggregation als Tannin **9**, da recht starke inhibierende Effekte nur bei einem hohen Überschuss (3 eq) des Liganden zu beobachten war.



**Abb. 57:** Inhibierender Effekt von Tannin **9** und Trimer-TEG **55** auf die A $\beta$ (1-42)-Aggregation. Die Liganden wurden jeweils in Konzentrationen von 198  $\mu$ M, 99  $\mu$ M, 33  $\mu$ M und 16.5  $\mu$ M zu einem 33  $\mu$ M A $\beta$ (1-42)-Aggregationsansatz gegeben.

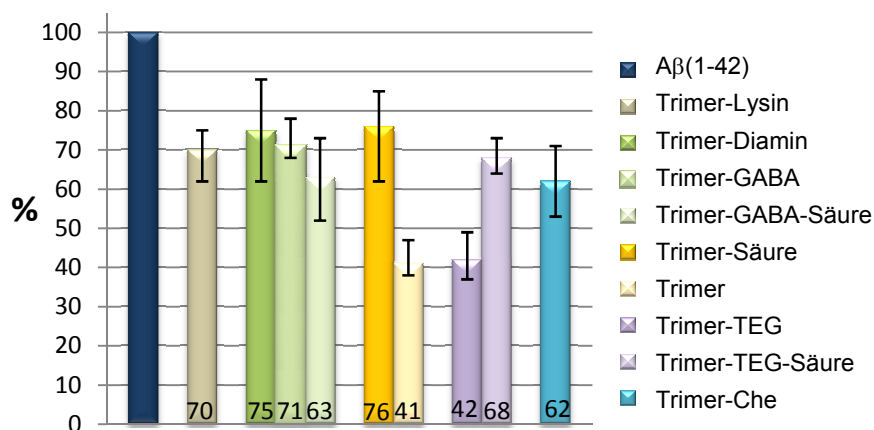
Nach den bereits erzielten Erfolgen wurden weitere Liganden synthetisiert und vermessen. Wie in **Abbildung 58** zu sehen ist, konnten fast alle Verbindungen die Fluoreszenzintensität um mindestens 67 % reduzieren. Die Liganden Amino-Trimer **35** und Trimer-Chg-Che **50** konnten das ThT-Signal nur um 40 % bzw. 47 % senken. Diese beiden Substanzen besitzen zwar eine hemmende Wirkung auf die Bildung von amyloiden Aggregaten, jedoch ist dieser Effekt nicht so stark wie bei den anderen Liganden. Die lipophilen Verbindungen Trimer-Lysin-Che **53** und Trimer-TEG-Che **58** hemmen die Aggregation erheblich. Die potenteste Verbindung war hier Trimer-KKKKKKG **59** mit einer Reduzierung des Fluoreszenzsignals um 75 %.



**Abb. 58:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die Aggregation des Aβ(1-42)-Peptids. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

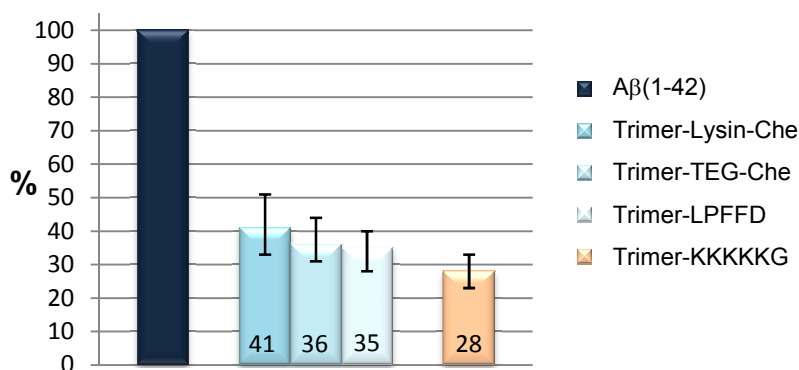
#### 3.3.1.4 Disaggregierende Wirkung der synthetisierten Liganden mit Aβ(1-42)

Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die Liganden einen Einfluss auf bereits bestehende Aβ-Aggregate wie z.B. Protofibrillen oder Fibrillen besitzen. Hierzu wurden nur Untersuchungen mit Aβ(1-42) vorgenommen. Um sicher zustellen, dass Aggregate vorlagen, wurden 33 μM Aβ(1-42) in 1 x PBS für 24 Stunden im Thermomixer (*Eppendorf AG, Hamburg*) bei 600 rpm inkubiert. Erst nach der Inkubation wurde der zu testende Ligand in einem sechsfachen Überschuss zugegeben. Die disaggregierende Wirkung der Liganden wurde über einen Zeitraum von 120 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 59** dargestellt. Alle untersuchten Liganden zeigten einen auflösenden Effekt auf bereits bestehende Aggregate. Hervorzuheben sind die Liganden Trimer **21** und Trimer-TEG **55**, welche die Fluoreszenzintensität um 59 % bzw. 58 % reduzieren. Alle anderen Substanzen zeigen einen schwächeren Einfluss.



**Abb. 59:** Disaggregation der Aβ(1-42)-Aggregate durch synthetisierte Liganden. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

In der nachfolgenden **Abbildung 60** sind weitere Liganden dargestellt, die auf ihre disaggregierenden Eigenschaften im ThT-Test untersucht wurden. Dabei wurden Aliquots, bestehend aus 33  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42) in 1 x PBS, für sieben Tage im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Ligandenzugabe (198  $\mu\text{M}$ ). Der Verlauf der Disaggregation wurde sieben Tage lang beobachtet. Die vier getesteten Liganden besitzen die Eigenschaft bereits bestehende amyloide Fibrillen wieder aufzulösen. Die zwei Verbindungen, die ein Cyclohexylethylamin in ihrer Struktur aufweisen, unterscheiden sich kaum in ihrer Wirkung. Trimer-LPFFD **60** konnte wie der Ligand Trimer **21** (**Abbildung 59**) die Fluoreszenzintensität um 59 % senken. Wie schon bei den Inhibierungsansätzen, sowohl mit A $\beta$ (1-40) als auch mit A $\beta$ (1-42), zeigte der Ligand Trimer-KKKKKKG **59** die stärkste disaggregierende Wirkung.



**Abb. 60:** Disaggregation der A $\beta$ (1-42)-Aggregate durch synthetisierte Liganden. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

### 3.3.2 CD-Spektroskopie

Die Circular-dichroismus-Spektroskopie (CD) ist eine fundamentale Methodik zur Charakterisierung der Sekundärstruktur von Proteinen. Bei diesem chiroptischen Messverfahren werden die beiden circular polarisierten Komponenten einer linear polarisierten Welle bei der Wechselwirkung mit optisch aktiven Substanzen unterschiedlich stark absorbiert.<sup>[178]</sup>

Durch die Überlagerung zweier senkrecht zueinanderstehender, um eine Viertel Wellenlänge gegeneinander verschobener Wellen mit gleicher Amplitude erhält man eine circular polarisierte Welle. Diese ist dadurch definiert, dass die Spitze des elektrischen Vektors schraubenförmig um die Ausbreitungsrichtung rotiert.<sup>[179]</sup> In der Projektion beschreibt die Vektorspitze eine Kreisbahn. Elliptisch polarisiertes Licht hingegen entsteht, wenn die zwei circular polarisierten Wellen ungleiche Amplituden besitzen.

Durchläuft linear polarisiertes Licht ein optisch aktives Medium, so sind die Lichtgeschwindigkeiten für links- bzw. rechtscircular polarisiertes Licht verschieden.

Für den Brechungsindex  $n$  gilt:

$$n = \frac{c_0}{c_M} \quad (1)$$

$c_0$ : Lichtgeschwindigkeit im Vakuum,  $c_M$ : Lichtgeschwindigkeit im Medium

Beim Durchgang einer Schicht der Dicke  $d$  erfährt eine circular polarisierte Komponente eine zeitliche Verzögerung gegenüber der anderen Komponente. Die Lichtstrahlen bewegen sich demnach mit unterschiedlichen Wellenlängen  $\lambda$  fort, wodurch der Summenvektor seine Richtung nicht beibehält, sondern um einen Winkel  $\alpha$  gedreht ist.  $\alpha$  wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\alpha_{(\lambda)} = \frac{180^\circ \cdot d}{\lambda} \cdot (n_L - n_R) \quad (2)$$

Abgesehen von den Lichtgeschwindigkeiten sind auch die Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_R$  verschieden. Ihre Differenz wird als Elliptizität  $\theta$  angegeben:

$$\theta_{(\lambda)} = \text{const.} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad \text{mit } \text{const.} = \ln 10 \cdot \frac{180}{2\pi} \approx 33 \quad (3)$$

$c$ : Konzentration

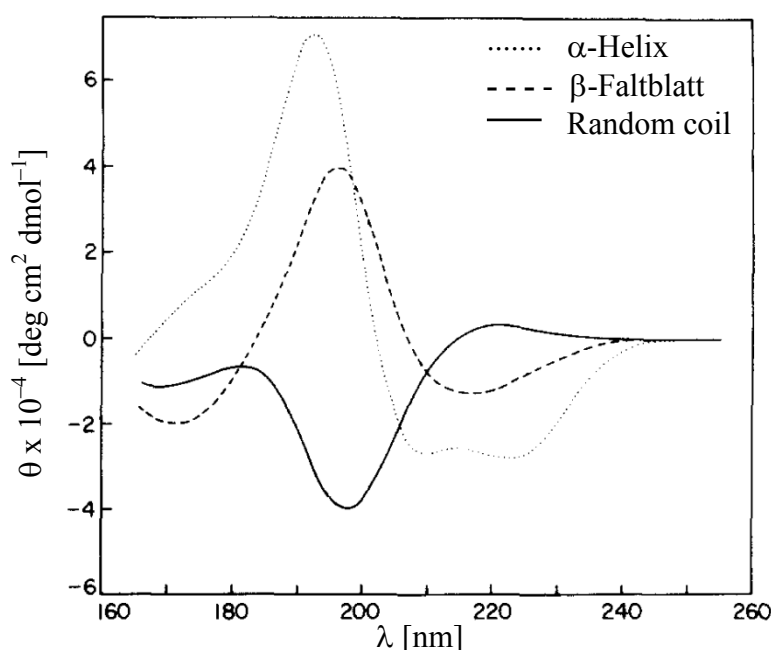
Circulardichroismus tritt nur dann auf, sofern die Elektronenanregung durch das einfallende Licht gleichzeitig mit einer Ladungs-Translation (elektrisches Dipolmoment, z.B. Charge-Transfer-Übergänge) und -Rotation (magnetisches Dipolmoment,  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge) verknüpft ist.<sup>[180]</sup> Dies ist gegeben, wenn ein Chromophor chiral ist.

In Proteinen bzw. Peptiden sind die Chromophore von Interesse, die folgendermaßen absorbieren<sup>[181]</sup>:

- Peptidbindung ( $n \rightarrow \pi^*, \pi \rightarrow \pi^*$ ) 220 nm, 190 nm
- Aromatische Aminosäuren ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) 260-320 nm
- Disulfidbrücken ( $n \rightarrow \sigma^*$ ) 260 nm

Zusätzlich können Cofaktoren über einen weiten, spektralen Bereich absorbieren.<sup>[182]</sup>

Die Auswertung von CD-Spektren erfolgt meistens durch Vergleich mit Referenzspektren der Sekundärstruktur.



**Abb. 61:** CD-Spektren mit verschiedenen Arten von Sekundärstrukturen.<sup>[183]</sup>

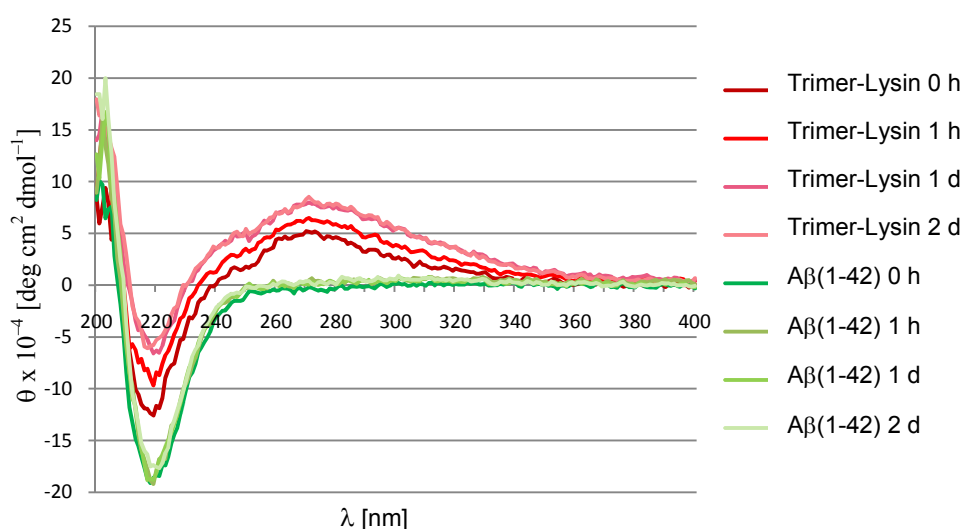
### 3.3.2.1 Ergebnisse der CD-Messungen

Es konnten lediglich von wasserlöslichen Substanzen CD-Messungen durchgeführt werden. War auch nur ein Prozent DMSO in der Lösung zugegen, so konnte kein aussagekräftiges Spektrum gemessen werden, da DMSO im relevanten Bereich absorbiert. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit fast aller synthetisierten Verbindungen konnten nur die



Liganden Trimer-Lysin **45**, Trimer-KKKKKG **59** und Trimer-Lysin-Che **53** mittels CD-Spektroskopie vermessen werden. Trimer-Lysin **45** und Trimer-KKKKKG **59** ließen sich problemlos in Wasser lösen. Trimer-Lysin-Che **53** musste, wie A $\beta$ (1-42) auch, in 100 % HFIP gelöst werden.<sup>[184]</sup> Diese Stammlösungen wurden verdünnt, so dass in den Proben mit Trimer-Lysin **45** und Trimer-KKKKKG **59** nur noch 2 % HFIP, bei Trimer-Lysin-Che **53** 4 % HFIP in der Lösung war. Die Messungen wurden in gepufferter, wässriger Lösung (Kaliumphosphatpuffer, pH = 7.3) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Spektren wurden über einen zeitlichen Verlauf von mehreren Stunden bzw. Tagen aufgenommen.

Betrachtet man in **Abbildung 62** die Graphen des A $\beta$ (1-42)-Peptids (grün), so sind deutlich negative Cotton-Effekte bei einer Wellenlänge von 219 nm und positive Cotton-Effekte bei 200 nm zu erkennen. Bei Peptiden in  $\beta$ -Faltblattkonformation sind üblicherweise ein negativer Cotton-Effekt bei 216 nm und ein positiver Cotton-Effekt bei 195 nm zu beobachten. Jedoch können diese Werte bei kleinen Peptiden um  $\pm 5$  nm abweichen.<sup>[185-187]</sup> Bereits nach sofortiger Zugabe des A $\beta$ (1-42)-Peptids in die gepufferte, wässrige Lösung liegt das Peptid in  $\beta$ -Faltblattkonformation vor.<sup>[184]</sup> Diese Konformation ist auch nach zwei Tagen unverändert (hellgrüne Kurve). Wird der Ligand Trimer-Lysin **45** zu A $\beta$ (1-42) hinzugegeben, so zeigt sich ebenfalls ein negativer Cotton-Effekt bei 219 nm und ein positiver Cotton-Effekt bei 200 nm. Es liegt eine  $\beta$ -Faltblattkonformation vor, wobei die molare Elliptizität kleiner ist. Daraus resultiert die Annahme, dass die  $\beta$ -Faltblattstruktur destabilisiert wird.

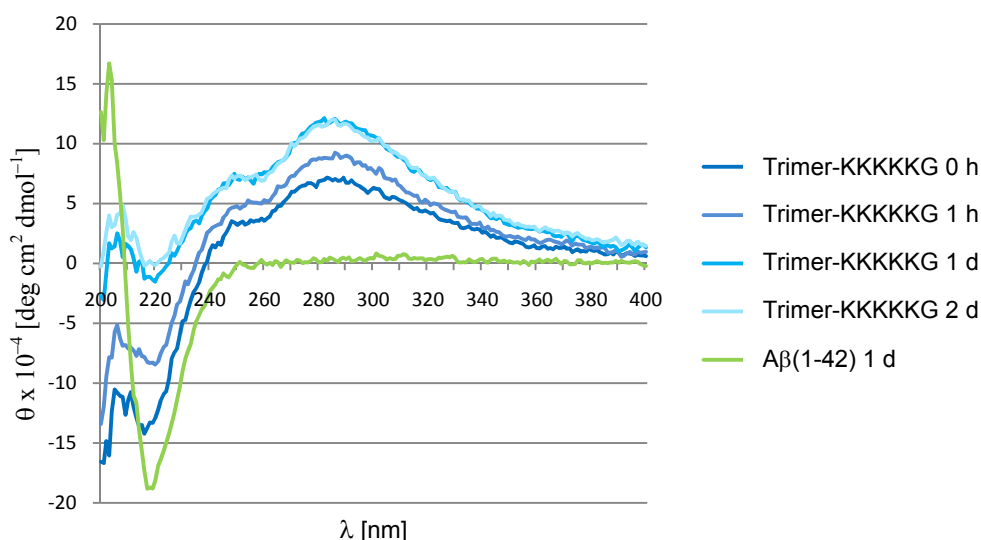


**Abb. 62:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42) ohne (grüne Graphen) und mit dem Liganden Trimer-Lysin **45** (rote Graphen). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur nach sofortiger Zugabe (0 Stunden), 1 Stunde, 1 Tag und 2 Tagen aufgenommen. Die Konzentrationen der Lösungen betrugen 10  $\mu$ M A $\beta$ (1-42), 5  $\mu$ M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.3), 2 % HFIP und 10  $\mu$ M Trimer-Lysin **45**.

Auffallend ist der neu entstandene positive Cotton-Effekt bei 270 nm. In dem Bereich zwischen 260 nm und 320 nm absorbieren aromatische Aminosäuren (Phe: 255-277 nm, Tyr: 275-282 nm, Trp: 290-305 nm).<sup>[181]</sup> Dieser neue positive Cotton-Effekt könnte durch eine mögliche Komplexierung des Liganden an die Phenylalanine, die in der A $\beta$ -Sequenz an den Positionen 19 und 20 auftreten, zustande kommen. Nach einer Stunde liegt ein analoger Kurvenverlauf mit einer geringeren Elliptizität vor. Selbst nach einem Tag ist ein ähnlicher Verlauf des Graphen zu erkennen. Die molare Elliptizität ist noch kleiner geworden. Die Aufnahme nach einem Tag bzw. zwei Tagen zeigt keinen Unterschied. In beiden CD-Spektren sind zwei positive Cotton-Effekte, einer bei 200 nm und einer bei 270 nm, und ein negativer Cotton-Effekt bei 219 nm zu sehen, die annähernd die gleiche molare Elliptizität besitzen. Der positive Cotton-Effekt bei 200 nm und der negative Cotton-Effekt bei 219 nm weisen darauf hin, dass der Komplex in einer  $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegt. Der Ligand Trimer-Lysin **45** scheint die Konformation kaum zu verändern, bildet jedoch wahrscheinlich mit den aromatischen Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids einen Komplex.

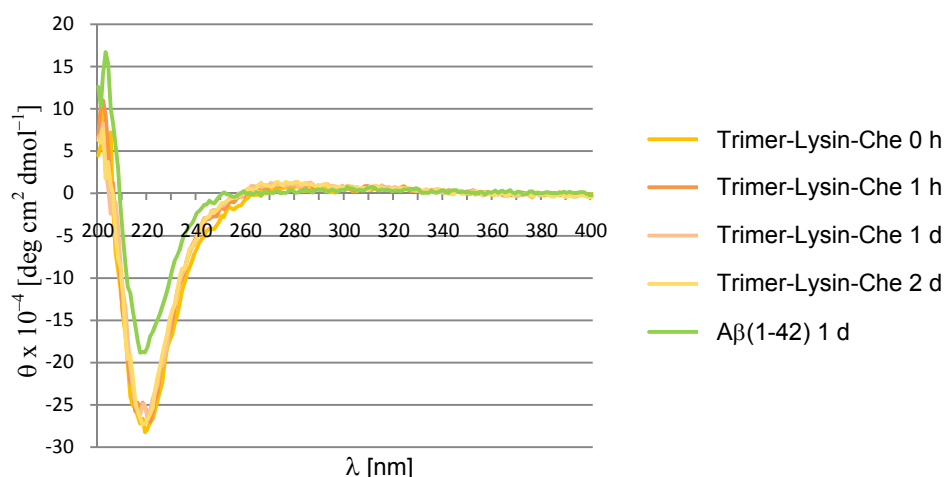
**Abbildung 63** zeigt die Wirkung des Liganden Trimer-KKKKKKG **59** (blaue Kurven) auf die Konformation. Zum besseren Vergleich ist eine Kurve des Kontrollansatzes (grüner Graph) im Spektrum dargestellt. Wird ein Spektrum direkt nach dem Zusatz des Liganden Trimer-KKKKKKG **59** zur A $\beta$ -Lösung gemessen, so scheint sich schon eine Änderung der Konformation zu ergeben. Es können ein negativer Cotton-Effekt bei 220 nm und zwei positive Cotton-Effekte, der eine bei 251 nm und der andere bei 282 nm, detektiert werden. Der charakteristische positive Cotton-Effekt bei 200 nm, der bei einer Konformation in  $\beta$ -Faltblatt auftritt, ist zwar nicht vorzufinden, jedoch ist der negative Cotton-Effekt bei 220 nm ein Indiz für die Anwesenheit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur. Da sich die CD-Kurve des Trimer-KKKKKKG **59** bei 200 nm im negativen Bereich der molaren Elliptizität befindet, könnte angenommen werden, dass der Ligand-A $\beta$ -Komplex in einem Random coil vorliegt. Der Vorteil bei CD-Messungen ist, dass die Zeitskala des CD-Experimentes schneller ist, als die konformationellen Modifikationen im Peptidrückgrat.<sup>[188]</sup> Deswegen könnte eine Überlagerung der Signale sowohl für eine  $\beta$ -Faltblattkonformation als auch für einen Random coil zu sehen sein. Wie bereits erwähnt absorbieren in einem Wellenlängenbereich von 260 nm – 320 nm aromatische Aminosäuren. Dies deutet, wie bei Trimer-Lysin **45**, auf eine Komplexbildung zwischen den Phenylalaninen in der A $\beta$ -Sequenz und dem Liganden hin. Die Kurve, die nach einer Stunde gemessen wurde, ist analog zu dem Spektrum nach

sofortiger Zugabe. Hier ist nur die molare Elliptizität höher. In dem nach einem Tag aufgenommenen CD-Spektrum ist wiederum ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, wobei der positive Cotton-Effekt bei 251 nm deutlicher zu erkennen ist. Das nach zwei Tagen vermessene Spektrum ist zu diesem fast identisch. Der Ligand Trimer-KKKKKKG **59** bewirkt deutlich eine Konformationsänderung und scheint mit den aromatischen Aminosäuren im A $\beta$ -Peptid einen Komplex zu bilden.



**Abb. 63:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42) ohne (grüner Graph) und mit dem Liganden Trimer-KKKKKKG **59** (blaue Graphen). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur nach sofortiger Zugabe (0 Stunden), 1 Stunde, 1 Tag und 2 Tagen aufgenommen. Die Konzentrationen der Lösungen betrugen 10  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42), 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.3), 2 % HFIP und 10  $\mu\text{M}$  Trimer-KKKKKKG **59**.

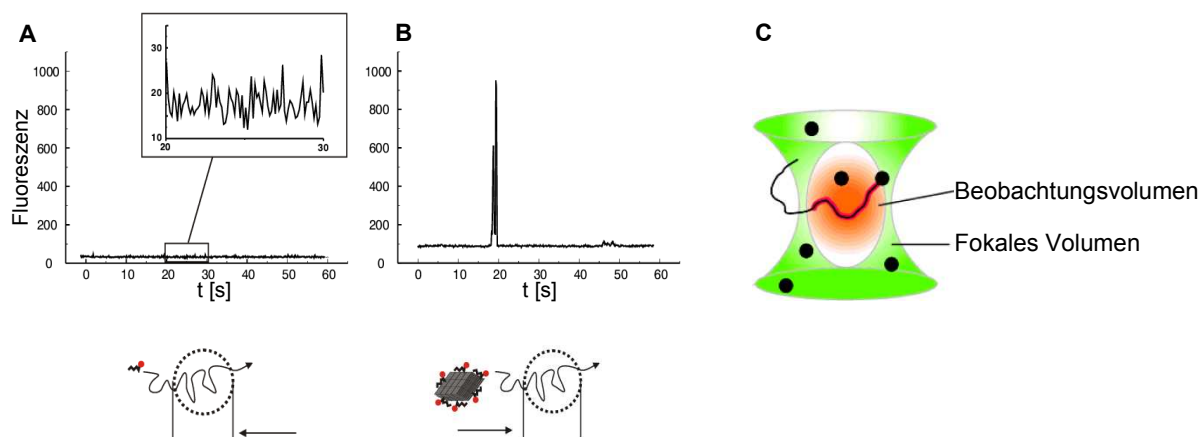
**Abbildung 64** präsentiert die Spektren, in denen der Ligand Trimer-Lysin-Che **53** zu der A $\beta$ -Lösung gegeben wurde. Die Graphen sind zu jedem Zeitpunkt identisch. Es lassen sich die typischen Merkmale für das Vorhandensein einer  $\beta$ -Faltblattkonformation beobachten; ein negativer Cotton-Effekt bei 219 nm und ein positiver bei 202 nm. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur scheint stabilisiert zu werden, da die molare Elliptizität gegenüber dem Kontrollansatz größer ist. Folglich verändert Trimer-Lysin-Che **53** die Konformation des A $\beta$ -Peptids nicht. Zudem wurde kein neuer positiver Cotton-Effekt im Bereich der aromatischen Aminosäuren detektiert. Demnach liegt keine Komplexbildung zwischen den aromatischen Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids und dem Liganden vor.



**Abb. 64:** CD-Spektren des Aβ(1-42) ohne (grüner Graph) und mit dem Liganden Trimer-Lysin-Che **53** (gelbe Graphen). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur nach sofortiger Zugabe (0 Stunden), 1 Stunde, 1 Tag und 2 Tagen aufgenommen. Die Konzentrationen der Lösungen betrugen 10  $\mu\text{M}$  Aβ(1-42), 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.3), 4 % HFIP und 10  $\mu\text{M}$  Trimer-Lysin-Che **53**.

### 3.3.3 FCS-Messungen (AK Willbold)

Die *Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie* (FCS) wurde in den frühen 70er Jahren maßgeblich von *Eigen* und *Rigler* entwickelt.<sup>[189]</sup> Dabei wird ein Laserstrahl auf ein Probenvolumen mit einem Durchmesser von weniger als einem Mikrometer fokussiert und die Fluktuation der Fluoreszenzintensität wird konfokal detektiert.<sup>[190]</sup> Diese Fluktuation wird durch die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Moleküle durch das Beobachtungsvolumen (**Abbildung 65C**) verursacht. Beobachtet man dieses Volumen über eine gewisse Zeit, so wird sich die Zahl der darin befindlichen Objekte ändern, obwohl sie verständlicherweise im Mittel gleich bleibt (**Abbildung 65A**). Aus der beobachteten Fluktuation der Fluoreszenzintensität über einen zeitlichen Verlauf kann durch eine Autokorrelationsanalyse der Diffusionskoeffizient der fluoreszierenden Moleküle bestimmt werden. Während der Zeit in der ein Partikel im Anregungsvolumen verweilt, kann es durch Reaktionen (chemisch oder photophysikalisch), Konformationsänderungen oder Aggregatbildung zu Modifikationen der charakteristischen Emission der Fluorophore kommen, wodurch eine zusätzliche Fluktuation des detektierten Signals verursacht wird. Es kann ein deutlicher Ausschlag (Burst) in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (**Abbildung 65B**). Eine Proteinaggregation kann demnach sowohl durch eine Erhöhung des ermittelten Diffusionskoeffizienten, als auch durch das Auftreten der Fluoreszenz-Bursts (Anzahl und Höhe der Ausschläge) belegt werden.



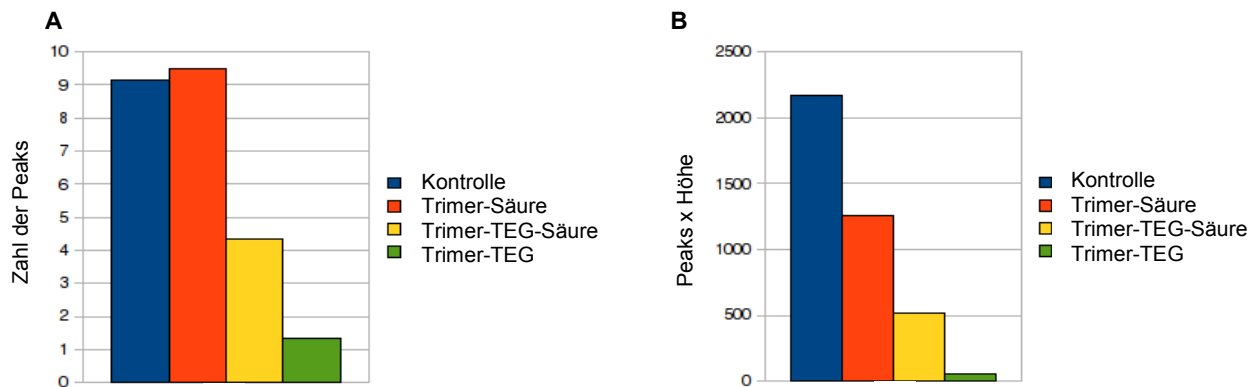
**Abb. 65:** A: Diffusion einzelner fluoreszenzmarkierter Moleküle durch das Beobachtungsvolumen. Die Fluktuation der Fluoreszenzintensität bleibt im Mittel gleich. B: Diffusion eines Aggregates aus mehreren fluoreszenzmarkierten Molekülen (Ausschlag eines Fluoreszenzsignals).<sup>[84]</sup> C: Vergrößerung des fokalen Volumens (grün), in dem die Partikel (schwarze Kreise) bestrahlt werden.<sup>[190]</sup>

Um den Aggregationsverlauf des A $\beta$ -Peptids detektieren zu können, musste ein Fluoreszenzfarbstoff eingeführt werden. Hierzu wurde A $\beta$ (1–42) mit dem Fluorophor Oregon-Green markiert, der auch bei nachfolgenden Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge eingesetzt wurde. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in einer Lösung von 5 nM A $\beta$ (1–42)-OG in 1 x PBS mit bzw. ohne Zusatz eines Liganden durchgeführt. Die Konzentration der Liganden betrug 10  $\mu$ M, was einem 2000-fachen Überschuss entspricht.

Aus technischen Gründen konnten bis jetzt nur vier der synthetisierten Verbindungen (Trimer **21**, Trimer-Säure **36**, Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62**) mittels Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie untersucht werden, wobei die Resultate des Liganden Trimer **21** bereits in der Dissertation<sup>[84]</sup> von P. Rzepecki diskutiert wurden und hier nicht näher darauf eingegangen wird.

In **Abbildung 66** sind die Ergebnisse der untersuchten Liganden, die über sechs Messungen gemittelt worden sind, gezeigt. In der linken Darstellung wird die Anzahl der Ausschläge des Fluoreszenzsignals abgebildet. Zu erkennen ist, dass der Ligand Trimer-Säure **36** (roter Balken) mehr *Fluoreszenz-Bursts* aufweist als der Kontrollansatz (blauer Balken). Demnach liegen mehr fluoreszenzmarkierte Aggregate in der Lösung vor. Die Inhibitoren Trimer-TEG-Säure **62** (gelber Balken) und Trimer-TEG **55** (grüner Balken) hingegen zeigen eine starke Verringerung an Ausschlägen. Durch den Zusatz von Trimer-TEG-Säure **62** im Aggregationsansatz kann die Zahl der Peaks um etwa die Hälfte vermindert werden, bei dem

Liganden Trimer-TEG **55** sogar um circa 85 %. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass letztere die Aggregation des A $\beta$ (1–42)-Peptids stark inhibieren.



**Abb. 66:** FCS-Messungen mit 5 nM A $\beta$ (1-42)-OG in 1 x PBS ohne Ligand (blauer Balken) und mit 10  $\mu$ M Liganden (rot: Trimer-Säure **36**, gelb: Trimer-TEG-Säure **62**, grün: Trimer-TEG **55**). A: Anzahl der Peaks. B: Größe der Ausschläge.

In der rechten Abbildung werden die Ausschläge mit ihrer Höhe multipliziert. Der Wert des Kontrollexperimentes liegt bei etwa 2100. Bei dem Liganden Trimer-Säure **36** ist der Wert auf ca. 1200 reduziert, was bedeutet, dass kleinere Aggregate vorliegen. Demnach scheint Trimer-Säure **36** zwar die Zahl der Aggregate geringfügig zu erhöhen, jedoch die Größe der Aggregate zu verkleinern. Trimer-TEG-Säure **62**, mit einem Wert von 500, verringert die Größe der Aggregate ebenfalls, jedoch nicht so stark wie Trimer-Säure **36**, da die Zahl der Peaks von vornherein geringer war. Das gleiche gilt für Trimer-TEG **55**. Dieser zeigt einen sehr niedrigen Wert an und vermindert ebenso die Aggregatgröße.

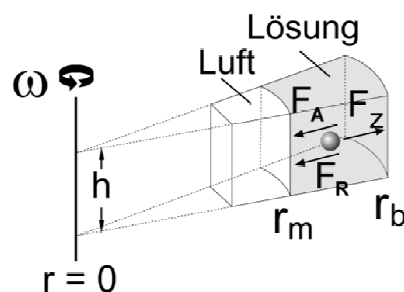
### 3.3.4 Analytische Ultrazentrifugation (AK Willbold)

Die analytische Ultrazentrifuge (AUZ) wurde in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts von *T. Svedberg*<sup>[191]</sup> (Nobelpreis 1926) entwickelt und vor allem für die Analytik von Proteinen und Kolloiden eingesetzt. Unter anderem können mit dieser Absolutmethode Molmassen, Teilchengrößenverteilungen sowie hydrodynamische und thermodynamische Eigenschaften von Proteinen und Makromolekülen ermittelt werden. Mit einer maximalen Drehzahl von derzeit 70 000 rpm, was einer 350 000-fachen Erdbeschleunigung entspricht, erzwingt dieses erzeugte Schwerefeld nahezu jeden Partikel zum Sedimentieren oder Flotieren. Dieser Vorgang wird optisch detektiert und anschließend ausgewertet. Bei der analytischen Ultrazentrifugation werden grundsätzlich zwei experimentelle Ansätze unterschieden.

Zum einen können Gleichgewichtszentrifugationen (Sedimentation Equilibrium; kurz SE- oder M-Lauf) durchgeführt werden, bei denen eine homogene Probe zentrifugiert wird, bis sich ein zeitunabhängiges Gleichgewicht von Sedimentation und Rückdiffusion einstellt. Bei diesem SE-Lauf können thermodynamische Informationen über beispielsweise die Molmasse und die Stöchiometrie gewonnen werden.

Das andere Experiment ist der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (Sedimentation Velocity; kurz SV- oder S-Lauf). Hierbei wird aus einem homogenen Gemisch durch die Zentrifugalkraft eine synthetische Grenzschicht aus sedimentierenden Molekülen erzeugt. Mittels Wanderungsverhalten und Form dieser Grenzschicht kann der Sedimentationskoeffizient  $s$  ermittelt werden. Dieser ist somit eine Funktion der Konzentrationsänderung über die Zeit entlang des Radius. Anhand dieser Konzentrationsprofile können hydrodynamische Informationen über die Größe und Form der Moleküle erhalten werden.<sup>[192]</sup>

Im Sedimentationsfeld ist ein Teilchen der Zentrifugalkraft ( $F_Z$ ) ausgesetzt, die von Partikeleigenschaften unabhängig ist. Dieser wirken sowohl die Auftriebskraft ( $F_A$ ), abhängig von Volumen ( $V$ ) und Dichte ( $\rho$ ) des Partikels, als auch die Reibungskraft ( $F_R$ ), abhängig von Größe und Form des Teilchens, entgegen (**Abbildung 67**).



**Abb. 67:** Schematische Darstellung einer sektorförmigen Messzelle.<sup>[193]</sup>

Innerhalb kürzester Zeit ( $<10^{-6}$  s) stehen diese drei Kräfte während der Zentrifugation im Gleichgewicht zueinander:

$$\underbrace{fv}_{F_R} + \underbrace{V\rho_0\omega^2r}_{F_A} - \underbrace{m\omega^2r}_{F_Z} = 0 \quad (4)$$

$F_R$  = Reibungskraft

$F_A$  = Auftriebskraft

$F_Z$  = Zentrifugalkraft

$f$  = Reibungskoeffizient des Moleküls

$v$  = Geschwindigkeit des Teilchens

$V$  = Volumen des Moleküls

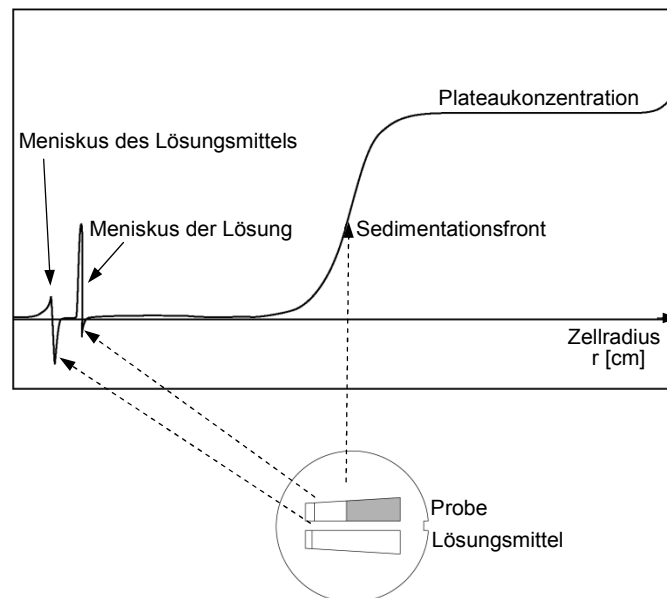
$\rho_0$  = Dichte des Lösungsmittels

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors

$r$  = Radius

$m$  = Masse des Moleküls

Während der Zentrifugation bildet sich die Sedimentationsfront aus, die mit konstanter Geschwindigkeit entlang des Radius wandert (**Abbildung 68**). Dabei ist die Geschwindigkeit dieser Grenzschicht direkt abhängig von der Masse und Form des Partikels, wobei die Masse des Makromoleküls Einfluss auf die Zentrifugalkraft hat und die Form des Moleküls über die Reibungskraft auf das Sedimentationsverhalten einwirkt.



**Abb. 68:** Darstellung einer Sedimentationsgrenzschicht.<sup>[194]</sup>

Die Wanderungsgeschwindigkeit, mit der sich ein Molekül unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegt, wird als Sedimentationskoeffizient  $s$  bezeichnet.<sup>[191]</sup> Durch die Umformung der Gleichung (4) wird die *Svedberg-Gleichung* (5) erhalten, die den Sedimentationskoeffizienten  $s$ , auch  $s$ -Wert genannt, darlegt:

$$\frac{v}{r\omega^2} = \frac{m(1-\bar{v}\rho_0)}{f} \equiv s \quad (5)$$

$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen

$s$  = Sedimentationskoeffizient

Der Sedimentationskoeffizient  $s$  besitzt die Einheit Svedberg [S], die wie folgt definiert ist:

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s.}$$

Da mit der Anreicherung der Teilchen am Zellboden die Rückdiffusion stärker wird, sind im Verlauf des Sedimentationsprozesses die Moleküle auch der Diffusion ausgesetzt. Die



zeitabhängige Konzentrationsänderung innerhalb einer sektorförmigen Messzelle für Moleküle mit den Transportgrößen in Form des Sedimentationskoeffizienten  $s$  und der Diffusionskonstanten  $D$  wird über die *Lammsche Differentialgleichung* (6) beschrieben.<sup>[195]</sup>

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r} \left[ \frac{\partial}{\partial r} \left( Dr \frac{\partial c}{\partial r} - s\omega^2 r^2 c \right) \right] \quad (6)$$

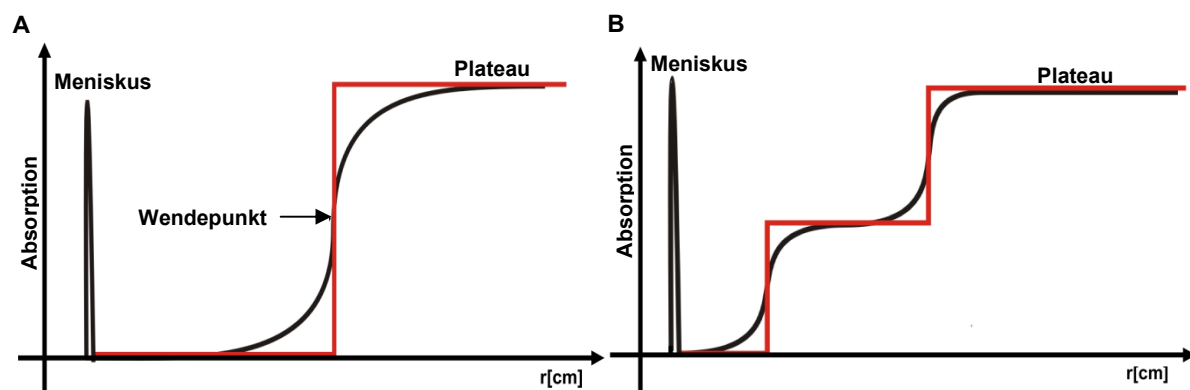
$c$  = Konzentration des Moleküls

$t$  = Zeit

$D$  = Diffusionskoeffizient des Moleküls

Für die Grenzschichten kann daher über den Konzentrationsgradienten zwischen Meniskus und Plateau, der durch den massenanteiligen Verlust an sedimentierendem Material entsteht, ein  $s$ -Wert beschrieben werden.

In Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten wird eine Konzentrationsverteilung innerhalb der Messzelle registriert, die direkt in eine  $s$ -Wert-Verteilung umgerechnet werden kann. Mit dem Sedimentationskoeffizienten kann die Aussage getroffen werden, wie schnell eine Komponente im Einheitsfeld um eine bestimmte Wegstrecke sedimentiert. Zur Berechnung des Sedimentationskoeffizienten wird in der klassischen Auswertung nur der Wendepunkt einer Sedimentationsgrenzschicht berücksichtigt (**Abbildung 69A**).



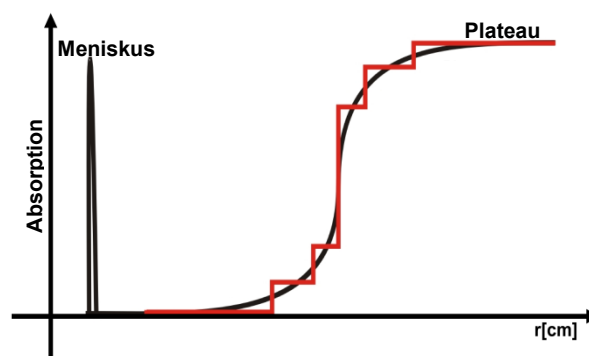
**Abb. 69:** A: Klassische Auswertung einer Sedimentationsgrenzschicht. B: Sedimentationsprofil für ein Zweikomponentensystem.<sup>[196]</sup>

Bei einer Mischung aus zwei nicht interagierenden Komponenten werden im einfachsten Fall zwei übereinander unabhängige Grenzschichten gebildet (**Abbildung 69B**). Wenn dabei die eine Komponente doppelt so schnell wie die andere sedimentiert, können zwei Wendepunkte erhalten und somit ausgewertet werden. In der Regel sedimentieren die Komponenten jedoch unterschiedlich schnell, wodurch es zu einer Überlagerung (Verbreiterung) der Grenzschichten kommt, welche eine Auswertung der Daten erschwert.

Eine Verbreiterung der Grenzschicht kann durch folgende Einflüsse hervorgerufen werden:

- Diffusion
- Existenz mehrerer Aggregatzustände eines Moleküls
- Multikomponentensystem.

Unter Berücksichtigung der Diffusion kann ermittelt werden, wie stark sich eine Grenzschicht durch die Diffusion einzelner Komponenten verbreitert, oder ob die Verbreiterung durch eine Überlagerung von mehreren Grenzschichten hervorgerufen wird. Liegt ein Multikomponentensystem vor, so ist eine einzelne verbreiterte Grenzschicht charakteristisch (**Abbildung 70**).



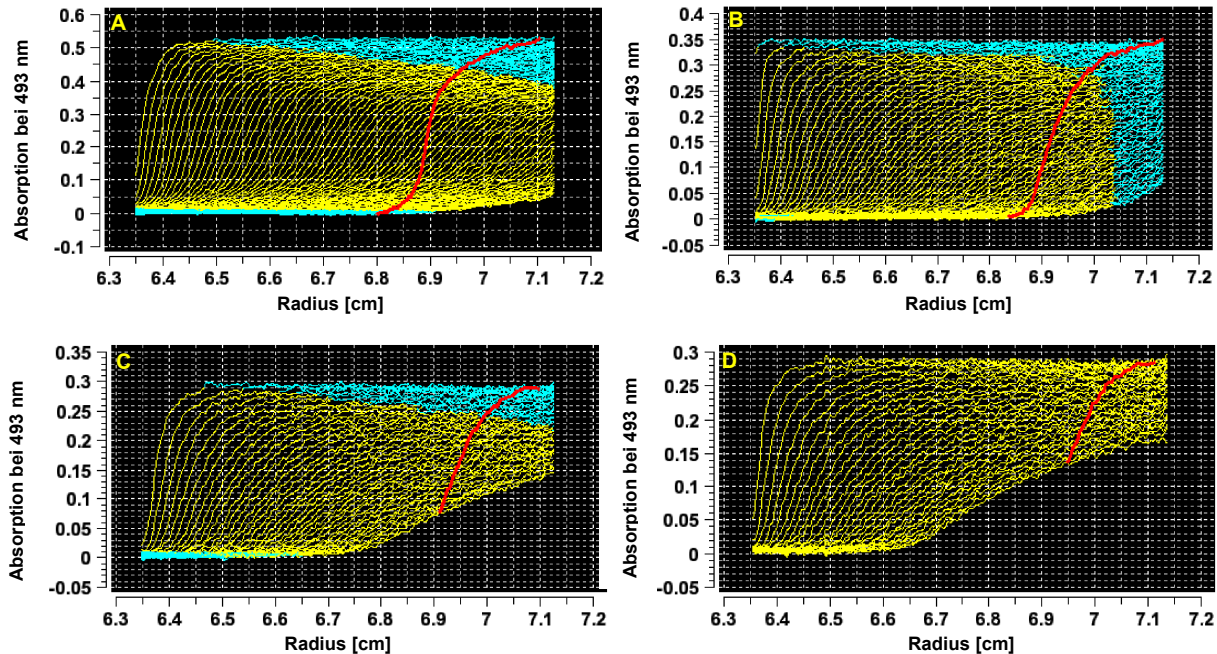
**Abb. 70:** Illustration einer verbreiterten Grenzschicht, hervorgerufen durch mehrere Komponenten (schwarze Kurve). Die unter Berücksichtigung der Diffusion angepasste Kurve für ein Multikomponentensystem ist rot markiert. Es ist zu erkennen, dass mehrere Komponenten zu unterschiedlichen Anteilen an der Bildung der Sedimentationsgrenzschicht beteiligt sind.<sup>[196]</sup>

Detaillierte Analysen für die  $s$ -Werte können durch eine Anpassung der Kurven, die auf die Auswertung der *Lamm Gleichung* basieren, erhalten werden. Durch den Einsatz von Computern und effizienten Algorithmen kann heutzutage jeder Messpunkt zur Auswertung verwendet werden. Daher kann auch für ein Multikomponentensystem über den Sedimentationsfluss für jede Komponente ein  $s$ -Wert ermittelt werden.<sup>[197,198]</sup>

### 3.3.4.1 Ergebnisse der Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation

Die Peptidkonzentration für die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe setzte sich jeweils aus 83 % A $\beta$ (1-42) und aus 17 % des mit Oregon-Green fluoreszenzmarkierten A $\beta$ -Peptids (A $\beta$ 42-OG) zusammen. Der Zusatz des Fluorophors ermöglicht es Messungen in niedrigen Konzentrationen durchzuführen. Die S-Läufe wurden bei einer Wellenlänge von 493 nm (Absorptionsmaximum von Oregon-Green) detektiert. In **Abbildung 71** sind die

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe für eine Lösung, bestehend aus 70  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42) und 14  $\mu\text{M}$  A $\beta$ 42-OG, gezeigt. Die Lösungen wurden unterschiedlich lange inkubiert und anschließend mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 20000 rpm gemessen.



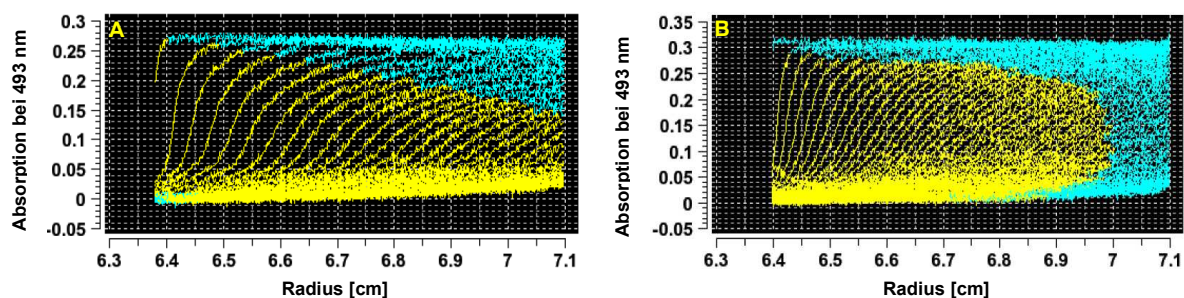
**Abb. 71:** Sedimentationsprofile einer A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG Aggregation (70  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42) und 14  $\mu\text{M}$  A $\beta$ 42-OG) in 10 mM NaPi (pH = 7.4) nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. A: nach fünf Stunden, B: nach einem Tag, C: nach zwei Tagen und D: nach fünf Tagen Inkubation.<sup>[199]</sup>

Je länger die Proben inkubieren, desto schneller sedimentieren die Partikel, und es kann angenommen werden, dass sich mehr Aggregate gebildet haben, die ein größeres Molekulargewicht besitzen. Betrachtet man die Größenverteilung der  $s$ -Werte untereinander, so ist ein deutlicher Anstieg von 30.3 S auf 47.6 S zu sehen (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** Sedimentationskoeffizienten der A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG Aggregation nach 0 Tagen, 1 Tag, 2 und 5 Tagen.<sup>[199]</sup>

0 Tage	1 Tag	2 Tage	5 Tage
30.3 S	39.4 S	44.1 S	47.6 S

Im Folgenden wurde der Ligand Trimer-Säure **36** mittels Ultrazentrifugationsexperimenten untersucht. Die in **Abbildung 72** dargestellten Sedimentationsprofile zeigen den Einfluss des Liganden auf die A $\beta$ -Aggregation nach einer Inkubation von fünf Tagen bei Raumtemperatur. Links sind die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe ohne die Zugabe des Liganden und rechts mit dem Liganden abgebildet.<sup>[199]</sup>



**Abb. 72:** Sedimentationsprofile einer A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG Aggregation in Gegenwart von Trimer-Säure **36**. In den Sedimentationsprofilen ist jeweils eine A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG (17.5  $\mu$ M/3.5  $\mu$ M) Aggregation in 10 mM NaPi (pH = 7.4) nach 5 Tagen Inkubation bei RT gezeigt. A: ohne Ligand, B: mit Ligand Trimer-Säure **36** (200  $\mu$ M).<sup>[199]</sup>

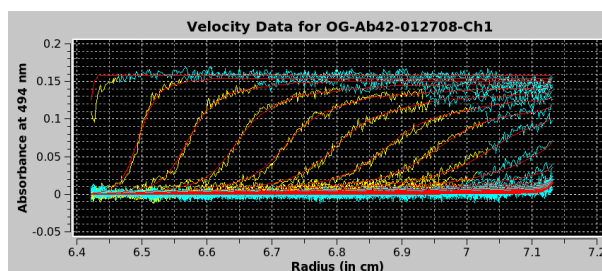
Es ist deutlich zu erkennen, dass die Grenzschichten in Abbildung **72A** flacher sind als die mit dem Liganden Trimer-Säure **36** (Abbildung **72B**). Demnach sedimentieren die Grenzschichten schneller und der Anteil an Aggregaten ist größer. Dies spiegelt sich in den s-Werten wider. Der Sedimentationskoeffizient der reinen A $\beta$ -Lösung beträgt 52 S. Der Zusatz des Liganden zu der A $\beta$ -Aggregation bewirkte eine Reduzierung des Koeffizienten auf 25.5 S und verringerte das durchschnittliche Molekulargewicht um 60 %.

Die Bedingungen während der AUZ-Messung werden so gewählt, dass möglichst keine großen Aggregate gebildet werden. Idealerweise bleiben die Aggregate in Lösung und präzipitieren nicht. Der Verlust von Material in Form von unlöslichen Aggregaten, die während der Beschleunigung sedimentieren, können quantifiziert werden. So konnte festgestellt werden, dass der Verlust, der auf unlösliches Material nach fünf Tagen Inkubation zurückzuführen ist, im Kontrollansatz 8 % und in der Probe mit dem Liganden weniger als 1 % betrug. Diese Werte resultieren aus dem Vergleich mit dem am ersten Tag gemessenen Mengen.<sup>[199]</sup>

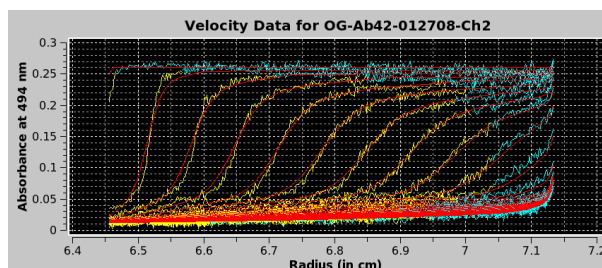
Aufgrund der starken Wirkung des Liganden Trimer-Säure **36** auf die A $\beta$ -Aggregation wurden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt.

Hierzu wurde der Ligand in verschiedenen Konzentrationen zu den A $\beta$ -Lösungen hinzugegeben und wieder für fünf Tage inkubiert. Die Ergebnisse nach der Inkubation sind in **Abbildung 73** dargestellt.

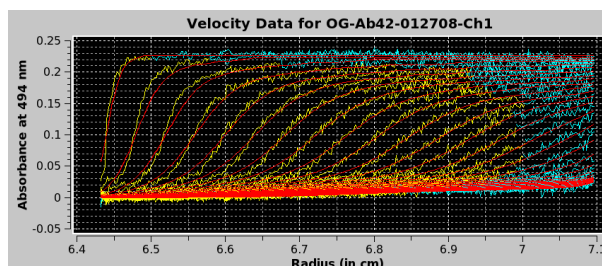
a) A $\beta$ (1-42) + 0  $\mu$ M Trimer-Säure **36**



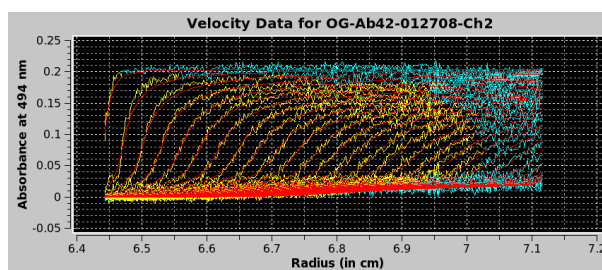
b) A $\beta$ (1-42) + 60  $\mu$ M Trimer-Säure **36**



c) A $\beta$ (1-42) + 120  $\mu$ M Trimer-Säure **36**



d) A $\beta$ (1-42) + 200  $\mu$ M Trimer-Säure **36**

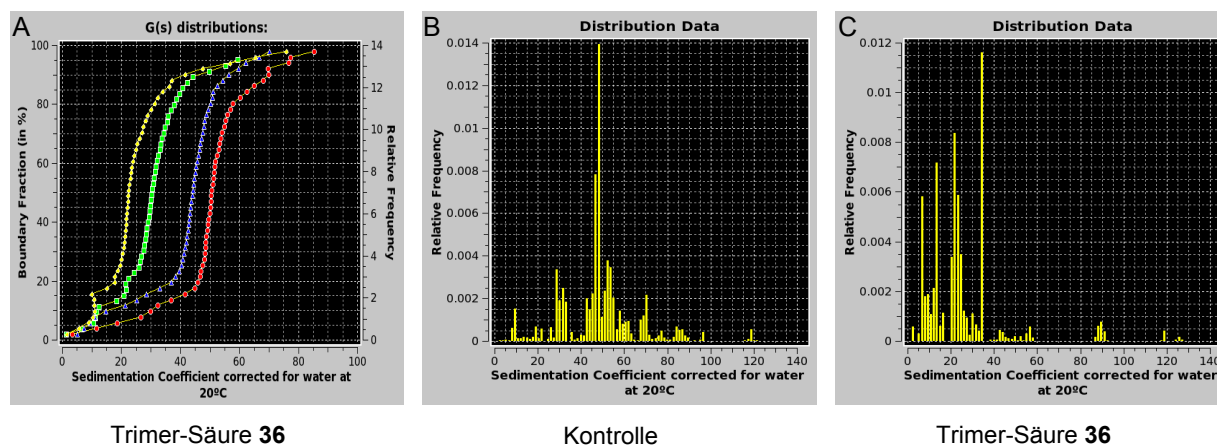


**Abb. 73:** Die Sedimentationsprofile zeigen jeweils eine A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG (17.5  $\mu$ M/7  $\mu$ M) Aggregation in 10 mM NaPi (pH = 7.4) nach 5 Tagen Inkubation bei RT. a) ohne den Liganden Trimer-Säure **36**, b) in Gegenwart von 60  $\mu$ M Trimer-Säure **36**, c) mit 120  $\mu$ M Trimer-Säure **36** und d) mit 200  $\mu$ M Trimer-Säure **36**. Die roten Linien zeigen die durch einen Algorithmus gefitteten Kurven.

Ohne den Zusatz des Liganden sedimentieren, wie bereits erwähnt, die Grenzschichten sehr schnell. Wird der Aggregationsansatz mit 60  $\mu$ M des Liganden versetzt, so sedimentieren die Grenzschichten etwas langsamer. In dem Sedimentationsprofil **73c**, in dem ein Überschuss von fast fünf Äquivalenten hinzugefügt wurde, zeigten sich mehr Grenzschichten. Dies lässt die Interpretation zu, dass zur gleichen Zeit (wie z.B. in **Abbildung 73b**) die Grenzschichten nicht so weit gelaufen sind und somit langsamer sedimentieren. Folglich werden auch die  $s$ -Werte bzw. die Molekulargewichte kleiner sein. Bei der Zugabe von 200  $\mu$ M Trimer-Säure **36** zu der A $\beta$ -Lösung ist die Sedimentationsgeschwindigkeit am niedrigsten. Dies kann besonders gut durch die steilen Anstiege der Sedimentationsfronten erkannt werden. Die gezeigten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Einfluss des Liganden auf die Aggregation des A $\beta$ -Peptids konzentrationsabhängig ist. Mit steigender Konzentration von Trimer-Säure **36** nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit der Grenzschichten ab. Demnach sind auch kleinere Aggregate in der Lösung vorhanden.



In **Abbildung 74** sind die  $s$ -Werte des Liganden Trimer-Säure **36** nach fünf Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen auf unterschiedliche Arten dargestellt.

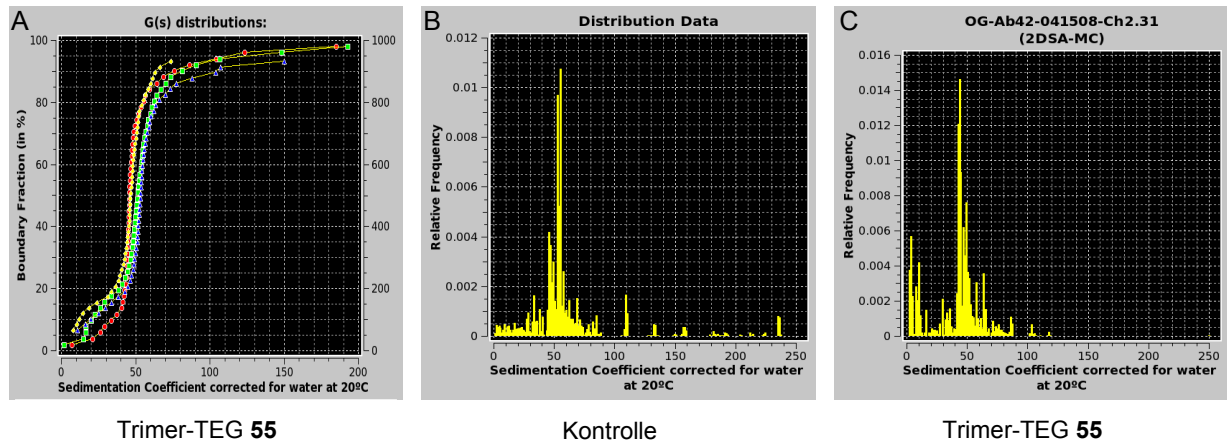


**Abb. 74:** A zeigt die  $s$ -Werte der Grenzsichten nach fünf Tagen Inkubation. Rot: Kontrolle A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG (17.5 µM/7 µM), blau: 66 µM Trimer-Säure **36**, grün: 133 µM Trimer-Säure **36**, gelb: 200 µM Trimer-Säure **36**. B: Darstellung der  $s$ -Wert-Verteilung des Kontrollansatzes nach fünf Tagen Inkubation. C:  $s$ -Wert-Verteilung nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von 200 µM Trimer-Säure **36**.

In **Abbildung 74A** ist zu erkennen, dass der Kontrollansatz einen  $s$ -Wert von etwa 50 S (rote Linie) besitzt. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf bei der Zugabe von 66 µM Trimer-Säure **36**. Hier wird deutlich, dass die  $s$ -Werte sich geringfügig verkleinern ( $\sim 45$  S). Der grüne Kurvenverlauf (Zugabe von 133 µM Trimer-Säure **36**) zeigt bereits einen signifikanten Unterschied zu dem Kontrollansatz. Es sedimentieren Partikel mit einem Sedimentationskoeffizient von 30 S, der bei einer Ligandenkonzentration von 200 µM auf 25.5 S sinkt. Dieses Diagramm stellt nochmals die konzentrationsabhängige Wirkung des Liganden Trimer-Säure **36** auf die A $\beta$ -Aggregation dar.

Die **Abbildungen 74B** und **74C** zeigen die  $s$ -Wert-Verteilungen ohne bzw. mit dem Liganden Trimer-Säure **36**, der in **Abbildung 74C** in einer Konzentration von 200 µM zu dem Aggregationsansatz hinzugefügt wurde. In dem Kontrollansatz (A $\beta$ 42/A $\beta$ 42-OG) liegen die  $s$ -Werte mit der höchsten relativen Frequenz in einem Bereich von 45-55 S. Mit der Ligandenzugabe konnte das Fehlen von Partikeln, die mit  $s$ -Werten größer 45 S sedimentieren, festgestellt werden. Dafür treten vermehrt neue Spezies mit einem Sedimentationskoeffizient von 22 S (74.4 % zwischen 16.4 S und 28.1 S) auf. Folglich reduziert der Ligand Trimer-Säure **36** das Molekulargewicht der A $\beta$ -Aggregate.

**Abbildung 75** zeigt die  $s$ -Werte des Liganden Trimer-TEG **55** nach fünf Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen in unterschiedlichen Darstellungen.



**Abb. 75:** A zeigt die  $s$ -Werte der Grenzsichten nach fünf Tagen Inkubation. Rot: Kontrolle A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG (17.5  $\mu$ M/7  $\mu$ M), blau: 66  $\mu$ M Trimer-TEG 55, grün: 133  $\mu$ M Trimer-TEG 55, gelb: 200  $\mu$ M Trimer-TEG 55. B: Darstellung der  $s$ -Wert-Verteilung des Kontrollansatzes nach fünf Tagen Inkubation. C:  $s$ -Wert-Verteilung nach fünf Tagen Inkubation in Anwesenheit von 200  $\mu$ M Trimer-TEG 55.

In **Abbildung 75A** sind die Grenzsichten nach einer Inkubation von fünf Tagen bei Raumtemperatur gezeigt. Es ist klar zu erkennen, dass der Ligand Trimer-TEG 55 keinen Einfluss auf die A $\beta$ -Aggregation hat. Der Kurvenverlauf des Kontrollansatzes (rote Linie) und die Kurven der Aggregationsansätze mit dem Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen (blau: 33  $\mu$ M, grün: 133  $\mu$ M, gelb: 200  $\mu$ M) liegen übereinander.

Betrachtet man die Diagramme **75B** und **75C**, in denen die  $s$ -Wert-Verteilungen ohne und mit dem Liganden Trimer-TEG 55 (200  $\mu$ M) gezeigt sind, so liegt die relative Häufigkeit der  $s$ -Werte im Kontrollansatz zwischen 50 S und 60 S. Auch bei der Messung mit dem Liganden sind die Werte im Bereich von 50 S und 60 S. Das vermehrte Auftreten von Partikeln im Bereich zwischen 0-15 S (**Abbildung 75C**) lässt die Schlussfolgerung zu, dass Trimer-TEG 55 scheinbar Partikel mit  $s$ -Werten kleiner 20 S stabilisiert und/oder generiert. Partikel mit  $s$ -Werten oberhalb 120 S sind im Gegensatz zur Kontrolle nicht mehr nachweisbar.

Weiterhin wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe aufgenommen, bei denen die Grenzsichten der Substanzen Trimer-Säure 36 und Trimer-TEG 55 mit A $\beta$ (1-42) bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum der Liganden) detektiert wurden. Mit dieser Methode sollte festgestellt werden, ob die Liganden mit A $\beta$  wechselwirken. Dies konnte für beide Liganden nachgewiesen werden. Der Ligand-A $\beta$ -Komplex sedimentierte jeweils mit einem Sedimentationskoeffizienten von 10 S. Wurden die Liganden unter den gleichen Bedingungen ohne A $\beta$ (1-42) in AUZ-Experimenten untersucht, so konnten allerdings auch hier Partikel gefunden werden, die bei Trimer-Säure 36 mit 10 S und bei Trimer-TEG 55 mit 8 S sedimentieren. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Liganden mit sich selbst aggregieren. Um diese Vermutungen zu verifizieren, wurden TEM-Aufnahmen angefertigt.

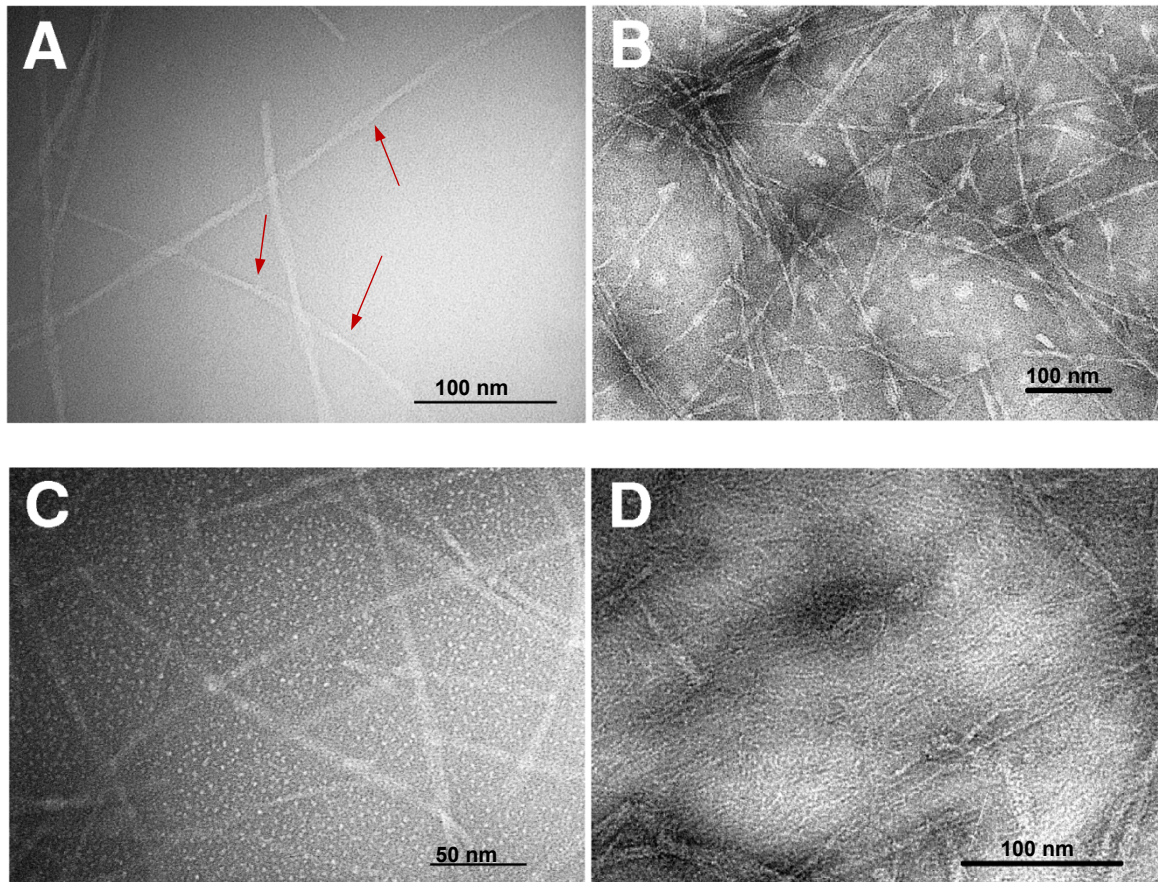
### 3.3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die *Transmissions-Elektronenmikroskopie* (TEM) dient unter anderem zur Aufklärung der atomaren Struktur anorganischer oder organischer Materialien, der Abbildung biologischer Objekte oder der Analytik chemischer Kompositionen. Bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie wird der Elektronenstrahl durch eine thermische Quelle oder einen Feldemitter als Strahlungsquelle erzeugt. Dabei durchdringt der Strahl das Präparat und wirft ein Abbild auf einen fluoreszenzbeschichteten Leuchtschirm, der beim Aufprall der Elektronen sichtbares Licht emittiert. Um eine elektrische Aufladung des Objekts durch den Elektronenstrahl zu vermeiden, wird die Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz aus Kohlenstoff, Gold oder einer Gold/Palladium-Legierung beschichtet.<sup>[200]</sup>

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde nur eine Substanz (Trimer-Säure **36**) mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht. Andere Verbindungen sind zurzeit in Vorbereitung. Als Kontrolle dienten zum einen A $\beta$ (1-42)-Ansätze ohne Ligandenzusatz und zum anderen wurde der Ligand separiert vermessen, um mögliche Artefakte von den Proteinaggregaten differenzieren zu können.

In den Ansätzen, die nur A $\beta$ (1-42) enthielten, konnten in den TEM-Aufnahmen hauptsächlich reife Fibrillen erkannt werden (**Abbildung 76A**). Nach *Goldsbury et al.* werden amyloide Aggregate, die eine Länge von 600 nm bis zu mehreren  $\mu$ m aufweisen, als reife Fibrillen definiert.<sup>[201]</sup> Diese reifen Fibrillen sind polymorph und weisen als weiteres charakteristisches Merkmal Windungen auf, die als „twisted ribbons“ bezeichnet werden. In **Abbildung 76A** sind diese Windungen durch rote Pfeile markiert. Neben den reifen Fibrillen konnten auch verschiedene Arten von globulären Partikeln detektiert werden. Der Durchmesser der größeren globulären Partikel beträgt zwischen 18.5 nm und 30 nm und sind in **Abbildung 76B** zu sehen. In der hoch aufgelösten TEM-Aufnahme **76C** sind kleinere globuläre Partikel zu erkennen, die einen Durchmesser von 3-4 nm besitzen. Die Aufnahme **76D** zeigt den Ansatz, mit A $\beta$ (1-42) und Trimer-Säure **36**. Hier ist die Anzahl an reifen Fibrillen im Gegensatz zum Kontrollansatz deutlich reduziert. Des Weiteren sind dünnere Filamente zu sehen, die weder in reinem A $\beta$ (1-42), noch mit dem Liganden alleine vorhanden sind. Diese Filamente besitzen eine Breite von 5 nm. Die Abschätzung der Länge wird allerdings durch die dicht gepackten Filamente erschwert.





**Abb. 76:** TEM-Aufnahmen. A: A $\beta$ (1-42) Fibrillen. B: A $\beta$ (1-42) Fibrillen zusammen mit größeren globulären und verlängerten Oligomeren. C: A $\beta$ (1-42) Fibrillen gemeinsam mit kleinen globulären Oligomeren. Hoch aufgelöste TEM-Aufnahme mit 135 kV. D: Mischung aus A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ 42-OG (21  $\mu$ M) und dem Liganden Trimer-Säure **36** (200  $\mu$ M) nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei Raumtemperatur.<sup>[199]</sup>

### 3.3.6 Diskussion

Der Krankheitsverlauf der an AD erkrankten Patienten scheint, laut Kaskaden-Hypothese, unmittelbar mit der Agglomeration von amyloiden Fibrillen des A $\beta$ -Peptids einherzugehen. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit die Fibrillogenese des A $\beta$ -Peptids in Gegenwart der synthetisierten Substanzen untersucht. Diese rational entworfenen  $\beta$ -Faltblattliganden sollten mit Hilfe diverser Messverfahren auf ihren inhibierenden bzw. disaggregierenden Einfluss auf die Fibrillenbildung getestet werden. Anhand der Ergebnisse sollte dann eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung zwischen den synthetischen Liganden und dem A $\beta$ -Peptid ermittelt werden können.

Um einen Überblick über die Einflüsse der synthetisierten Liganden auf das Aggregationsverhalten zu gewinnen, wurden diese zunächst mittels Thioflavin T-Test untersucht. Da ThT eine spezifische Affinität zu amyloiden Strukturen aufweist, können gezielt Fibrillen und Strukturen mit einer  $\beta$ -faltblattreichen Konformation detektiert und quantifiziert werden. Um das Bild über die Wirkung der Liganden auf die Aggregation des A $\beta$ -Peptids zu vervollständigen, wurden in dieser Arbeit außerdem analytische Ultrazentrifugationen, transmissions-elektronenmikroskopische, CD- und fluoreszenz-korrelationsspektroskopische Aufnahmen angefertigt. Zudem wurden Energieminimierungen zwischen den Liganden und einer pentameren Protofibrille vorgenommen. Von einigen Verbindungen werden zurzeit in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Sticht* Molekül-Dynamik-Simulationen berechnet.

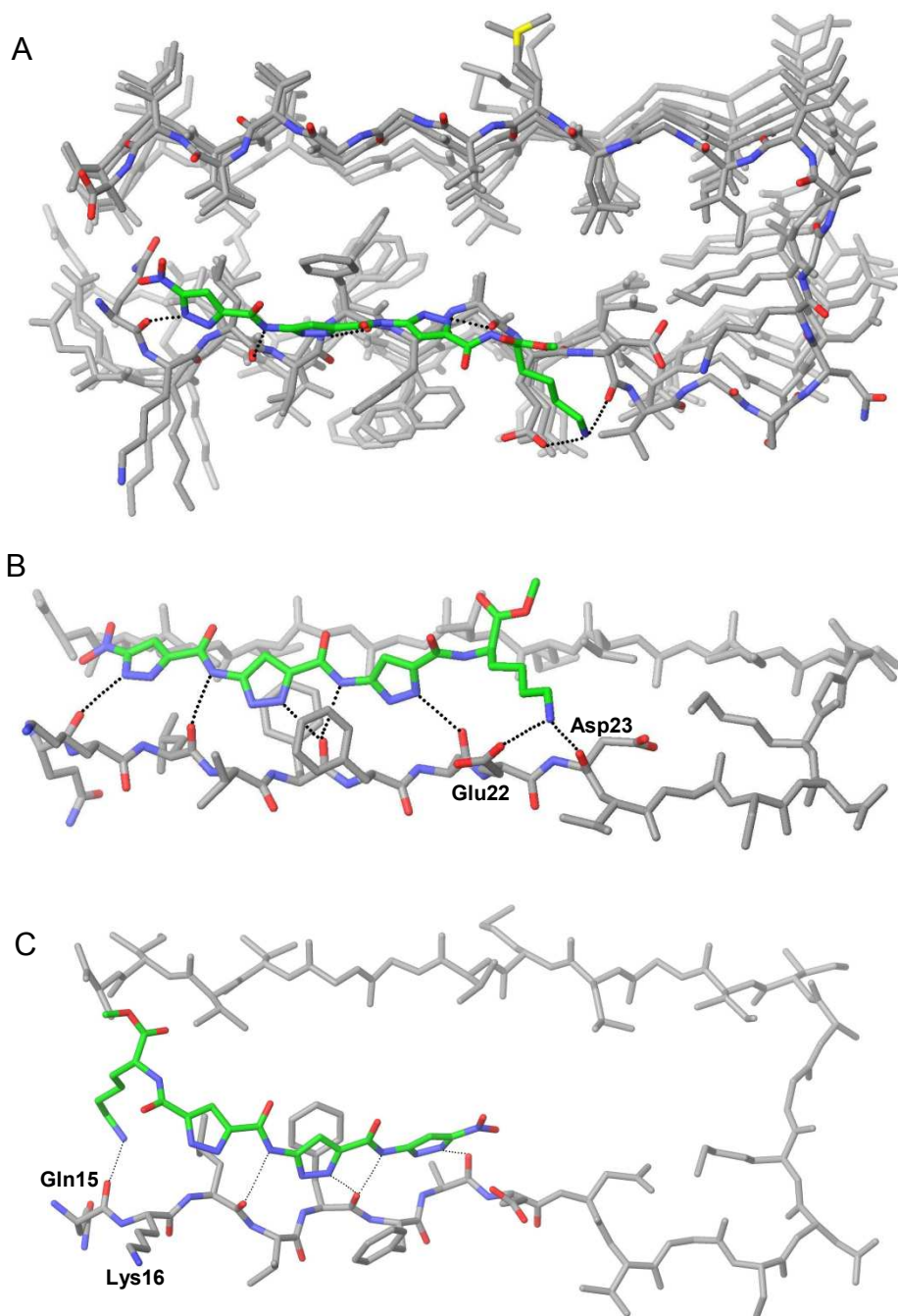
#### Einfluss des Liganden Trimer-Lysin 45 auf A $\beta$ (1-42)

Wie in **Abbildung 55** (in **3.3.1.3**) zu erkennen ist, beschleunigt der Ligand Trimer-Lysin **45** die A $\beta$ -Aggregation und besitzt kaum einen auflösenden Effekt auf bestehende amyloide Fibrillen. Dies zeigt sich ebenfalls in CD-spektroskopischen Untersuchungen. Da im Kontrollansatz das A $\beta$ (1-42)-Peptid von Anfang an in einer  $\beta$ -Faltblattkonformation vorlag, würde man bei der Zugabe des Liganden eine disaggregierende Wirkung erwarten. Durch die Zugabe des Liganden blieb jedoch die  $\beta$ -Faltblattkonformation auch noch nach zwei Tagen bestehen. Im Gegensatz zum Kontrollansatz sank die molare Elliptizität im  $\beta$ -Sheet Maximum, was bedeuten könnte, dass die  $\beta$ -Faltblattkonformation geringfügig destabilisiert wird. Des Weiteren wurde ein neuer positiver Cotton-Effekt bei einer Wellenlänge von

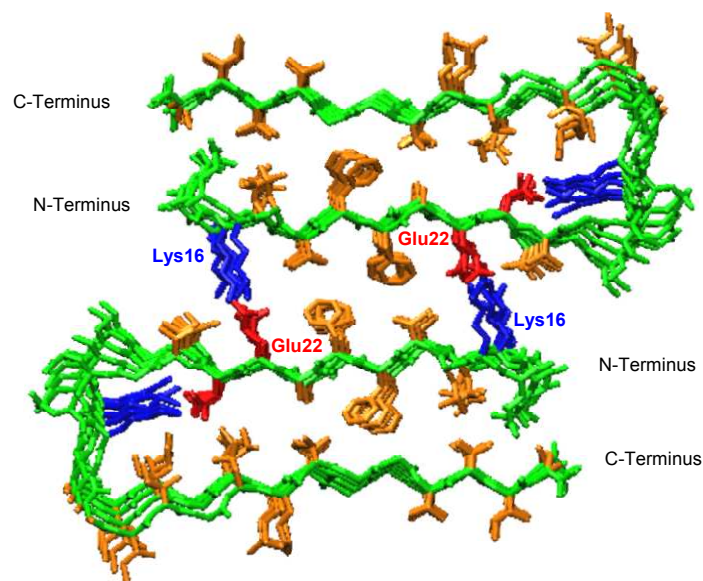
270 nm beobachtet. Dieser wird wahrscheinlich durch eine Komplexbildung zwischen dem Liganden und den Phenylalaninen des A $\beta$ -Peptids hervorgerufen und bestätigt die vermutete Wechselwirkung der Pyrazole mit den aromatischen Aminosäuren im A $\beta$ -Peptid (**Abbildung 24**, in 2). Allerdings kann nicht gesagt werden, in welcher Orientierung Trimer-Lysin **45** zwischen den Phenylalaninen vorliegt.

Mit dem Programm MacroModel wurden Kraftfeldrechnungen durchgeführt, um mögliche Wechselwirkungen der Liganden mit dem A $\beta$ -Peptid zu simulieren. Als Ausgangsstruktur wurde die von Lührs publizierte Protofibrille verwendet.<sup>[144]</sup> Die Liganden wurden dabei so vororientiert, dass sie, senkrecht zu dem Peptidrückgrat stehend, über möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen an das A $\beta$ -Peptid binden. Zudem wurde der zweite Pyrazolring zwischen den Phenylalaninen (19) und (20) des Peptids in einer hydrophoben Tasche angeordnet, wodurch der Komplex *in silico* zusätzlich über  $\pi$ - $\pi$ -Stapel-Wechselwirkungen stabilisiert wird. Die Komplex-Strukturen wurden in Wasser mit dem Kraftfeld OPLS-2005 und jeweils 1500 Schritten minimiert.

Bei einer Energieminimierung zwischen dem Liganden Trimer-Lysin **45** und einer pentameren Protofibrille (**Abbildung 77A**) wurde beobachtet, dass das Lysin ein Ionenpaar mit dem Glutamat an Position (22) und dem Aspartat (23) bildet (**Abbildung 77B**). Eine weitere Möglichkeit ist in **Abbildung 77C** dargestellt. Trimer-Lysin **45** komplexiert hier in der entgegengesetzten Richtung mit dem A $\beta$ -Peptid, so dass das Lysin mit Glutamin (15) in Wechselwirkung tritt. Ähnlich dieser Komplexierung wäre auch eine parallele Anordnung des Lysins zu dem Lysin (16) des A $\beta$ -Peptids denkbar. Eine Beschleunigung der Fibrillenbildung könnte dadurch hervorgerufen werden, dass das Ammoniumion der Lysinseitenkette eine intra- oder intermolekulare Salzbrücke bildet, was eine Anlagerung einer zweiten U-förmigen Protofibrille bewirken könnte (**Abbildung 77D**).<sup>[202]</sup> Zudem ist Lysin nach der Hofmeister Serie eine kosmotrope Verbindung, welche die Struktur von Proteinen stabilisieren kann.<sup>[103]</sup>



D



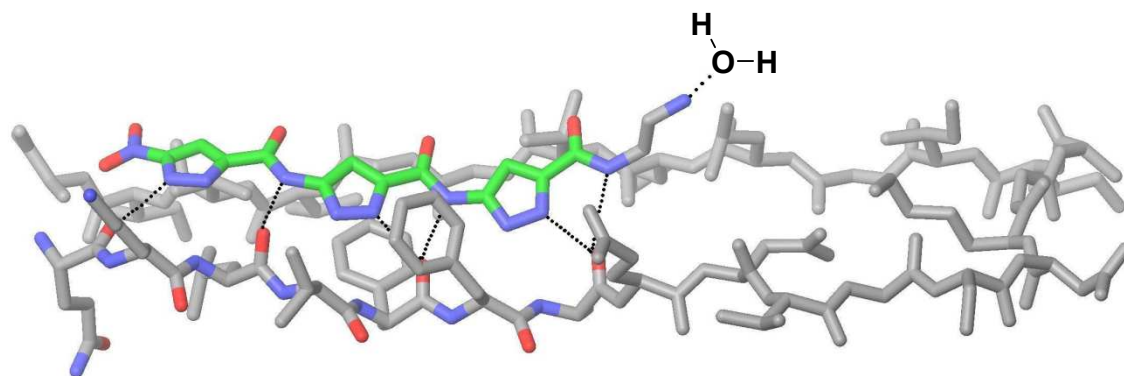
**Abb. 77:** Energieminimierung zwischen Trimer-Lysin **45** und einer pentameren Protofibrille (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte). A: Draufsicht. B und C: Seitenansicht. D: Zwei Protofibrillen, die über ein N/N-Interface miteinander verknüpft sind.<sup>[202]</sup>

In den nachfolgenden Abbildungen wird zur vereinfachten Darstellung stets der Komplex zwischen dem Liganden und nur dem obersten U-förmigen Aβ-Molekül gezeigt.

#### Einfluss von Trimer-Diamin **43**, Trimer-GABA **38** und Trimer-GABA-Säure **40** auf Aβ(1-42)

Die Liganden Trimer-Diamin **43**, Trimer-GABA **38** und Trimer-GABA-Säure **40** scheinen zu kurz zu sein, um mit anderen Aminosäurenresten in Nachbarschaft spezifisch in Wechselwirkung treten zu können. Betrachtet man die Ergebnisse im ThT-Test, so wirken sich diese kurzkettigen Verbindungen im Vergleich zum Trimer sogar nachteilig auf die Aggregation aus. Dies zeigt sich auch in den Energieminimierungen (**Abbildung 78**). Eine mögliche Ursache für diese Effekte kann die starke Solvatisierung der ionischen Gruppen sein, die sich in der Nähe der Wasserstoffbrückenbindungseinheit des Aminopyrazols befinden und dadurch die Anlagerung an das Aβ-Peptidrückgrat behindern.



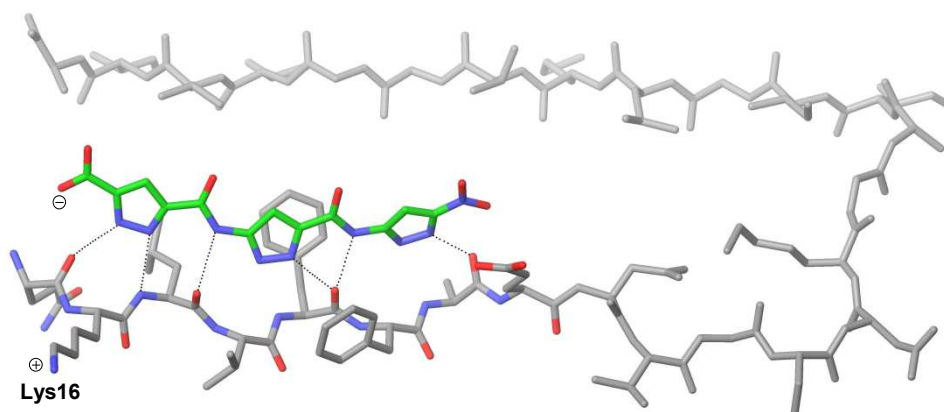


**Abb. 78:** Minimierte Komplexstruktur zwischen Trimer-Diamin **33** und einer pentameren Protofibrille (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

### Einfluss der Liganden Trimer-Säure **36** und Amino-Trimer **35** auf A $\beta$ (1-42)

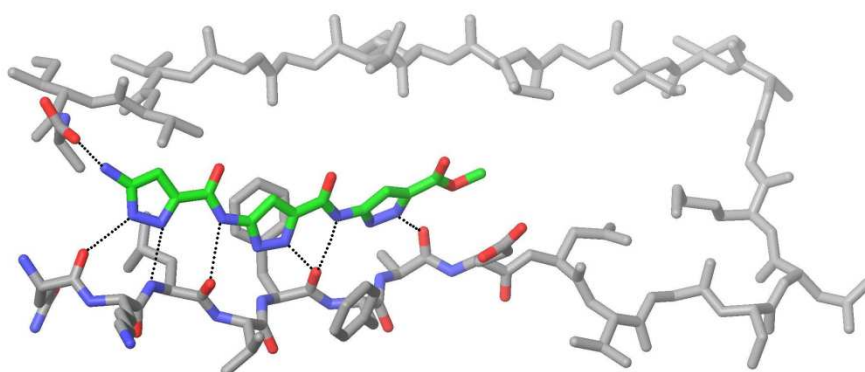
Der Ligand Trimer-Säure **36** wurde systematisch untersucht. Obwohl die Verbindung in den ThT-Untersuchungen einen moderaten Einfluss auf die A $\beta$ -Aggregation zeigte, wurde in FCS- und AUZ-Experimenten beobachtet, dass der Ligand fähig ist, große Aggregate aufzulösen. In FCS-Messungen wurde durch die Zugabe des Liganden Trimer-Säure **36** die Anzahl der Ausschläge im Vergleich zum Kontrollansatz geringfügig erhöht, jedoch konnte die Größe der Aggregate deutlich verkleinert werden. Des Weiteren zeigte Trimer-Säure **36** in konzentrationsabhängigen Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit der höchsten Konzentration den stärksten Effekt. Der Sedimentationskoeffizient des reinen A $\beta$ -Peptids wurde von 52 S auf 25.5 S in Gegenwart des Liganden reduziert. Zudem konnten Partikel mit einem *s*-Wert größer 45 S nicht mehr beobachtet werden. Es traten verstärkt neue Spezies mit einem *s*-Wert von 22 S (74.4 % zwischen 16.4 S und 28.1 S) auf. Demzufolge verringert Trimer-Säure **36** das Molekulargewicht der A $\beta$ -Aggregate. Da in den ThT-Messungen die Fluoreszenzintensität nur geringfügig verringert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die generierten Aggregate weiterhin in einer  $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegen. Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen sollten die komplexierenden bzw. inhibierenden Fähigkeiten des Liganden Trimer-Säure **36** überprüft werden. In der Probenaufnahme mit dem Liganden **36** sah man eine Fülle an dünneren Filamenten, die weder mit A $\beta$  ohne Ligandenzusatz noch in den Aufnahmen mit dem Liganden selbst aufzufinden waren. Außerdem war eine reduzierte Zahl an reifen Fibrillen zu erkennen. Somit weist der Ligand auf eine Inhibierung der lateralen Zusammenschlüsse von Protofilamenten hin. Die TEM-Aufnahmen bestätigten die Resultate der FCS- und AUZ-Untersuchungen. Trimer-Säure **36** verhindert nach Rechnungen

wahrscheinlich die Fibrillenbildung durch eine Kombination von hydrophoben Wechselwirkungen und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen am Peptidrückgrat der KLVFF-Sequenz (**Abbildung 79**). Des Weiteren kann angenommen werden, dass die Carboxylgruppe des Liganden ein Ionenpaar mit dem Lysin an Position (16) bildet, wodurch die Lys(16)-Glu(22) Salzbrücke des N/N-Interface destabilisiert wird (**Abbildung 77D**).



**Abb. 79:** Minimierte Komplexstruktur zwischen Trimer-Säure **36** und einer pentameren Protofibrille (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

Der Ligand Amino-Trimer **35** zeigte, ähnlich wie Trimer-Säure **36**, im ThT-Test einen schwachen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des A $\beta$ -Peptids. Derzeit kann noch nicht gesagt werden, ob der Ligand ebenfalls vermehrt kleine Aggregate, die in einer  $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegen, generiert oder die  $\beta$ -Faltblattstruktur stabilisiert. In Energieminimierungen zeigte sich, dass, gegenüber dem Liganden Trimer **21**, eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit Alanin an Position (42) im Gegenstrang gebildet wird (**Abbildung 80**), wodurch die  $\beta$ -Faltblattstruktur eher destabilisiert wird.



**Abb. 80:** Energieminimierung zwischen Amino-Trimer **35** und einer pentameren Protofibrille (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

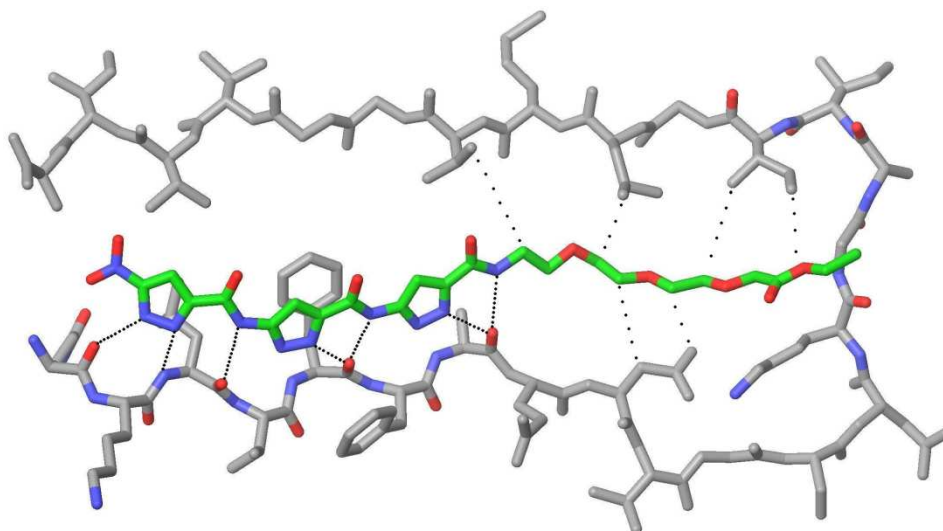
Einfluss der Liganden Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62** auf A $\beta$ (1-42)

In den Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T konnten mit den Liganden Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62** recht starke Wirkungen erzielt werden. Mit der Verbindung Trimer-TEG **55** wurde in FCS-Messungen die Zahl der *Fluoreszenz-Bursts* um etwa 75 % dezimiert. Demnach lagen sehr wenige amyloide Aggregate vor und die Aggregatgröße wurde anscheinend vermindert. Mittels analytischer Ultrazentrifugation zeigte sich, dass der Ligand keinen signifikanten Einfluss auf die mittleren Aggregatgrößen zu besitzen (**Abbildung 75**, in **3.3.4.1**) scheint, stattdessen aber Partikel mit *s*-Werten kleiner 20 S stabilisiert und/oder generiert. Zudem sind Partikel mit *s*-Werten oberhalb 120 S im Gegensatz zur Kontrolle nicht mehr nachweisbar.

Auch mittels analytischer Ultrazentrifugation zeigte sich, dass Partikel mit *s*-Werten kleiner 20 S stabilisiert und/oder generiert werden. Jedoch scheint der Ligand keinen signifikanten Einfluss auf die mittleren Aggregatgrößen zu besitzen (**Abbildung 75**, in **3.3.4.1**). Wie in der berechneten Komplexstruktur zwischen Trimer-TEG **55** und einer Protofibrille dargestellt (**Abbildung 81**), „interkaliert“ der polare Linker zwischen beiden Peptidsträngen und scheint im Bereich des  $\beta$ -Turns schwache dispersive Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäuren-Seitenketten einzugehen. Die inhibierenden Effekte auf die Aggregation können dahingehend interpretiert werden, dass sich kein weiteres U-förmiges  $\beta$ -Faltblatt anlagern kann, da die Oberseite der Protofibrille durch die Verbindung vollständig blockiert wird. Der Linker könnte interkalierend ein  $\beta$ -Faltblatt aufweiten und daraus resultierend die  $\beta$ -Faltblattstruktur destabilisieren.

Der Ligand Trimer-TEG-Säure **62** verringerte in FCS-Experimenten die Zahl der Fluoreszenzausschläge um die Hälfte und die Größe der Aggregate wurde reduziert. Dieser Einfluss auf die Aggregation des A $\beta$ -Peptids könnte wie bei Trimer-TEG **55** zum einen durch eine Blockierung der Oberseite der Protofibrille und zum anderen durch eine Aufweitung des  $\beta$ -Faltblattes erklärt werden. Im Vergleich zu dem Liganden Trimer-TEG **55** bildet die Carboxylgruppe zusätzlich im  $\beta$ -Turn-Bereich intramolekular ein Ionenpaar mit dem Lysin an Position (28).



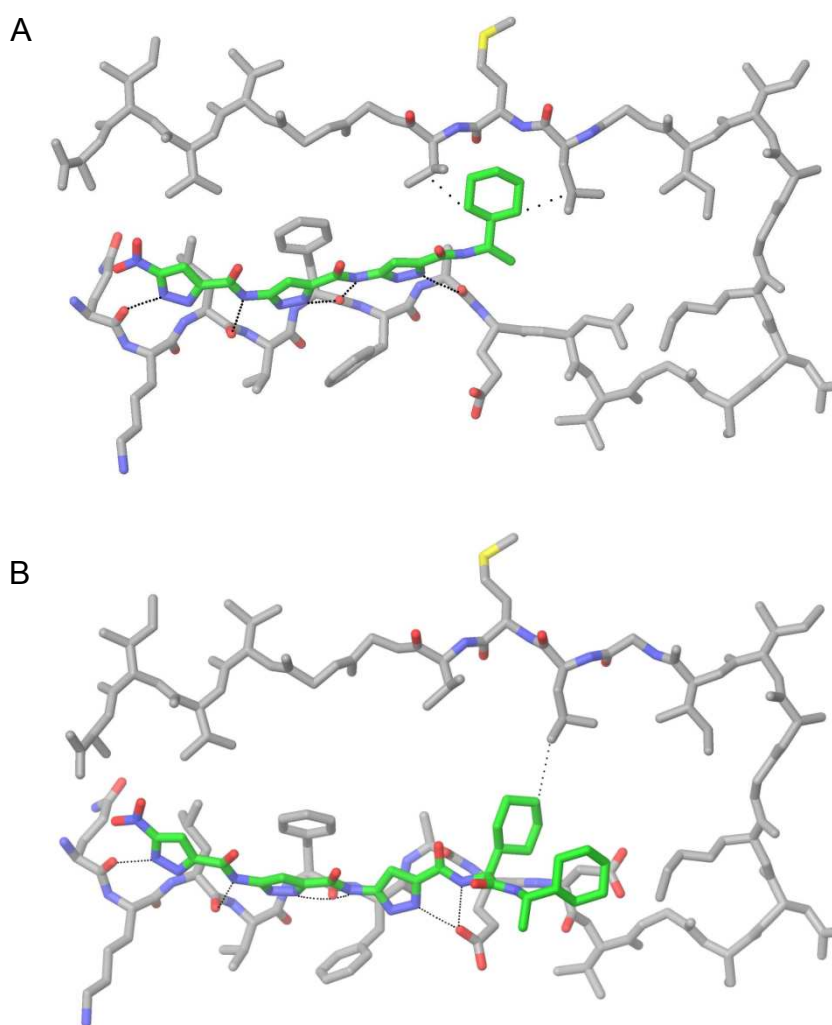


**Abb. 81:** Minimierte Komplexstruktur zwischen Trimer-TEG **55** und einer pentameren Protofibrille (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

### Einfluss der lipophilen Liganden auf A $\beta$ (1-42)

Die lipophilen Verbindungen (Trimer-Che **47**, Trimer-Chg-Che **50**, Trimer-Lysin-Che **53**, Trimer-TEG-Che **58** und Trimer-LPFFD **60**) hemmen, bis auf Trimer-Chg-Che **50**, die Aggregation beträchtlich. In CD-spektroskopischen Messungen bewirkte der Ligand Trimer-Lysin-Che **53** dabei keinerlei Änderung der Peptid-Konformation. Selbst nach zwei Tagen sind die aufgenommenen Spektren identisch, und es liegt sogar eine stabilisierte  $\beta$ -Faltblattkonformation vor. Ob Lysin, als kosmotrop agierend, für die Stabilisierung verantwortlich ist, kann zurzeit nicht gesagt werden. Dieses Resultat widerspricht scheinbar den Ergebnissen mit den Thioflavin T-Experimenten. Dort zeigte sich ein starker Effekt auf die Auflösung von amyloiden Aggregaten. Eventuell wurden die Ergebnisse im ThT-Test dadurch verfälscht, dass die Verbindung präzipitierte. Sichtbare Aggregate konnten während den CD-Messungen jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin konnte kein induzierter Cotton-Effekt im Bereich der aromatischen Aminosäuren in den CD-Spektren beobachtet werden. Möglicherweise ziehen die starken dispersiven Wechselwirkungen das Pyrazoltrimer aus seiner aromatischen Tasche heraus. Dadurch könnte sich Trimer-Lysin-Che **53** im  $\beta$ -Turn-Bereich an das Peptidrückgrat binden, wobei Lysin inter- oder intramolekular eine Salzbrücke mit Aspartat (23) bilden und die  $\beta$ -Faltblattkonformation stabilisieren kann. Um die unterschiedlichen Ergebnisse erläutern zu können, sollte diese Verbindung mit weiteren Methoden untersucht werden.

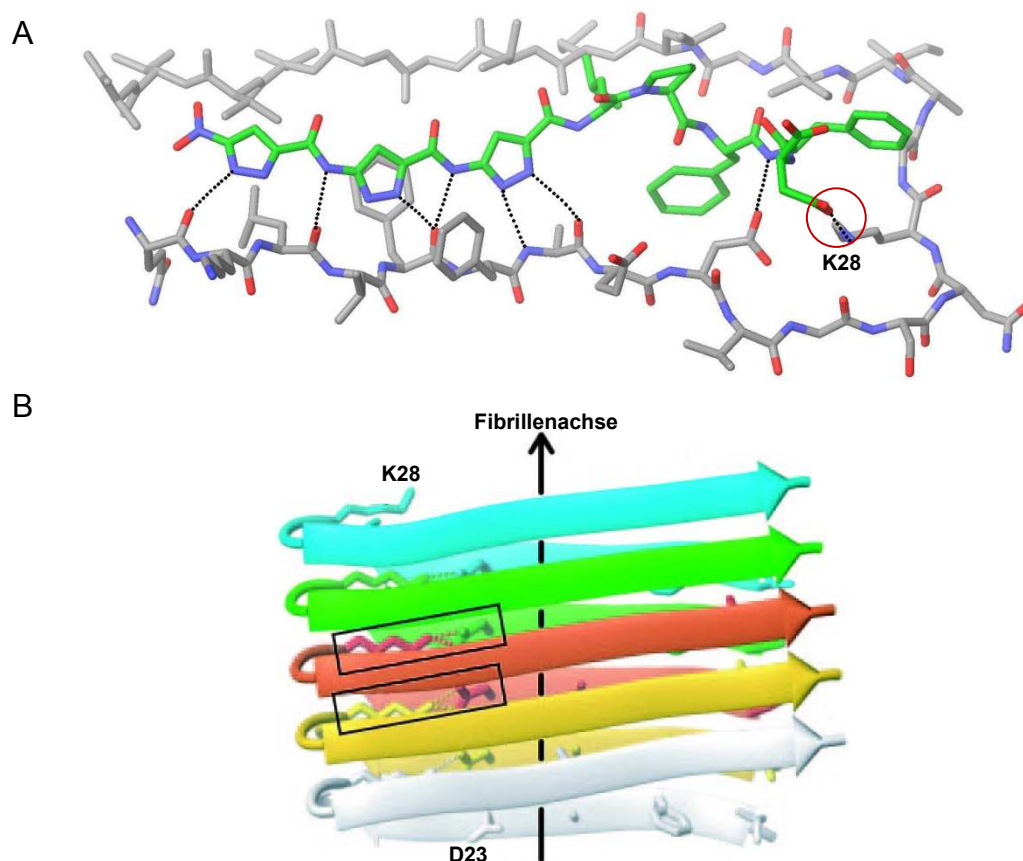
Die Ursache für den schwächeren Einfluss der Verbindung Trimer-Chg-Che **50** gegenüber Trimer-Che **47** kann unter Betrachtung der Energieminimierung erklärt werden. Wie in **Abbildung 82A** zu sehen ist, lagert sich der Cyclohexylrest an die unpolare Seitenketten im Bereich von Ile(32)-Leu(34)-Val(36) an und geht hydrophobe sowie dispersive Wechselwirkungen mit diesen ein. Bei Trimer-Chg-Che **50** scheint der zweite Cyclohexylring aus sterischen Gründen die Anlagerung im hydrophoben Bereich zu behindern (**Abbildung 82B**). Somit kann der erste Cyclohexylring nur schwache hydrophobe bzw. dispersive Wechselwirkungen eingehen. Zudem zeigt der zweite lipophile Cyclohexylring keinerlei spezifische Wechselwirkungen mit den Aminosäuren im polaren Bereich.



**Abb. 82:** Energieminimierung zwischen einer pentameren Protofibrille und Trimer-Che **47** (A) bzw. Trimer-Chg-Che **50** (B) (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

Der Ligand Trimer-LPFFD **60** wirkte im Thioflavin T-Test stark inhibierend bzw. disaggregierend auf die A $\beta$ -Fibrillogenese. Dieser Einfluss kann durch mehrere Gründe verursacht werden. Mit der Aminosäure Prolin, ein  $\beta$ -sheet-breaker, ist ein Element eingeführt worden, das die  $\beta$ -Faltblattstruktur destabilisiert. Wegen des ringförmigen Aufbaus von Prolin

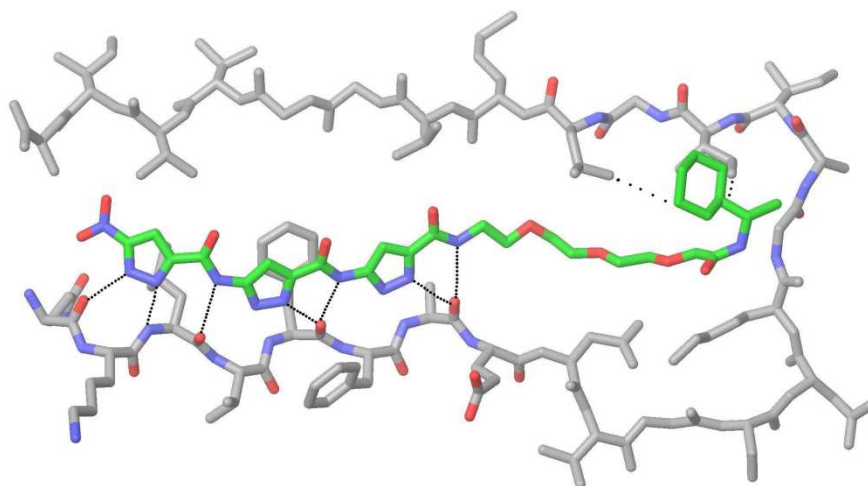
wird ein Knick in der Struktur erwirkt, wodurch sich ein Phenylalanin über hydrophobe und disperse Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Ile (32) und Leu (34) in die Protofibrille einlagern (**Abbildung 83A**) kann. Dies könnte zu einer Aufweitung und daraus resultierend zu einer Destabilisierung der  $\beta$ -Faltblattkonformation führen. Das zweite Phenylalanin könnte aus sterischen Gründen eine Anlagerung eines weiteren  $\beta$ -Faltblattes auf der Oberseite verhindern. Bei einer Energieminimierung zwischen einer pentameren Protofibrille und dem Liganden Trimer-LPFFD **60** konnte beobachtet werden, dass das Carboxylation der Asparaginsäure mit dem Lysin (28) im  $\beta$ -Turn-Bereich eine Salzbrücke bildet. Dies könnte ebenfalls zu einer Destabilisierung der  $\beta$ -Faltblattstruktur führen, da normalerweise Lysin (28) mit Aspartat (23) intermolekular eine Salzbrücke eingeht (**Abbildung 83B**).<sup>[144]</sup>



**Abb. 83:** A: Minimierter Komplex zwischen einer pentameren Protofibrille und Trimer-LPFFD **60** (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte). B: Inter-molekulare Salzbrücke zwischen den Resten D (23) und K (28), gekennzeichnet durch gestrichelte Linien.<sup>[144]</sup>

Trimer-TEG-Che **58** zeigte ebenfalls einen stark hemmenden Einfluss auf das Aggregationsverhalten des A $\beta$ -Peptids. Wie schon bei Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62** gezeigt, kann der Linker eine Aufweitung des  $\beta$ -Faltblattes bewirken (**Abbildung 84**). Zudem wird der Komplex durch van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert. Der Cyclohexylring lagert sich zwischen die Aminosäuren Ile (32) und Leu (34) und geht

hydrophobe und dispersive Wechselwirkungen mit diesen ein, wodurch eine Aufweitung des  $\beta$ -Faltblattes verstärkt werden kann. Eine Destabilisierung ist die Folge.



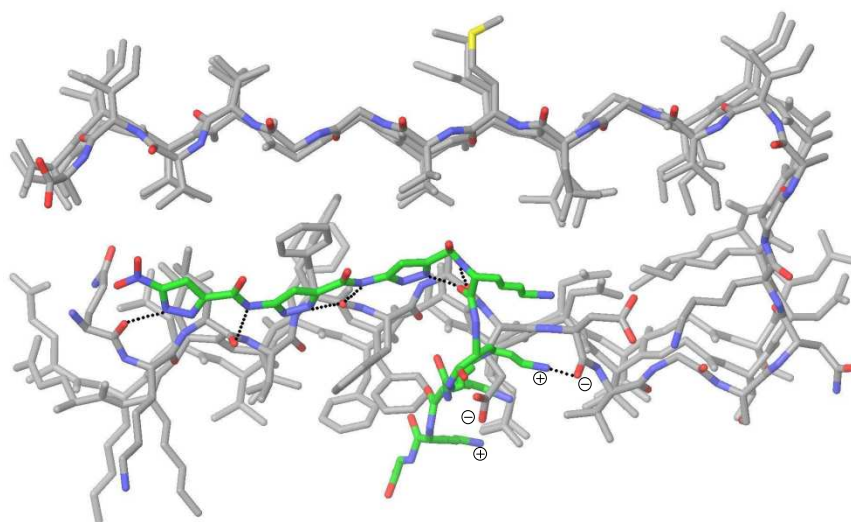
**Abb. 84:** Energieminimierung zwischen einer pentameren Protofibrille und Trimer-TEG-Che **58** (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Schritte).

#### Einfluss des Liganden Trimer-KKKKKKG **59** auf A $\beta$ (1-42)

Der Ligand Trimer-KKKKKKG **59** war die potenteste Verbindung bezüglich ihrer inhibierenden und disaggregierenden Eigenschaften auf die A $\beta$ -Fibrillogenese. In CD-Messungen zeigte **59** eindeutige konformative Effekte. Die Verbindung bindet an die aromatischen Aminosäuren im A $\beta$ -Peptid und es kann angenommen werden, dass die Aggregate vorwiegend als Zufallsknäuel vorliegen. Dies würde bedeuten, dass der Ligand bereits existierende amyloide Aggregate auflösen kann. Auch in ThT-Tests kann die disaggregierende Wirkung des Liganden Trimer-KKKKKKG **59** bestätigt werden. Demzufolge besitzt der Ligand einen starken Einfluss auf die Aggregation und löst sogar bestehende Aggregate wieder auf. Die minimierte Komplexstruktur zwischen Ligand und dem A $\beta$ -Peptid unterstützen diese Interpretation. Die Ammoniumionen der Lysine binden an die Carboxylationen der Glutamate (22) entlang der Protofibrille (**Abbildung 85**). Die  $\beta$ -Faltblattkonformation kann möglicherweise durch diese starken Coulomb-Wechselwirkungen aufgelöst werden. Dieses Ergebnis scheint widersprüchlich zu den publizierten Daten von *Gibson & Murphy* zu sein.<sup>[103]</sup> Diese verknüpften die Selbsterkennungssequenz KLVFF mit Hexalysinen und bemerkten eine Beschleunigung der Aggregation. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Lysine, als kosmotrop wirkend, die Oberflächenspannung erhöhen und somit die A $\beta$ -Polymerisation beschleunigt wird. Eine

mögliche Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Effekte ist, dass sich die Verbindung KLVFF-KKKKKK nicht senkrecht, sondern parallel zu dem Peptidrückgrat befindet und somit auch nicht die „Glutamat-Leiter“ stabilisieren kann.

Die Verbindung Trimer-KKKKKK **59** könnte allerdings auch in den ThT-Experimenten präzipitiert sein und Fibrillen mit einer anderen Morphologie gebildet haben, die nur schwach von Thioflavin T angefärbt werden können, da sie, wie in den CD-Spektren zu sehen ist, nicht mehr in einer  $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegen. Dadurch könnte das Ergebnis verfälscht worden sein.



**Abb. 85:** Energieminimierter Komplex zwischen einer pentameren Protofibrille und dem Liganden Trimer-KKKKKK **59** (MacroModel 8.0, OPLS-2005, Wasser, 1500 Iterationen).

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue  $\beta$ -Faltblattliganden entwickelt, die auf ihre aggregierende bzw. disaggregierende Wirkung bezüglich des in der AD auftretenden A $\beta$ -Peptids untersucht wurden. Als Leitstruktur diente dabei das Trimer **21**, dessen Synthese optimiert werden konnte. Ausgehend von dieser Komponente wurden erfolgreich mehrere unterschiedlich funktionalisierte Liganden unter bekannten Kupplungsbedingungen synthetisiert. Die Verknüpfung von Peptidsequenzen an das Trimer **21** erfolgte problemlos mit manueller bzw. automatisierter Fmoc-Festphasenpeptidsynthese.

Die synthetisierten Liganden wurden mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden wie analytische Ultrazentrifugation, CD-Spektroskopie, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, Transmissions-Elektronenmikroskopie und Thioflavin-T Experimenten *in vitro* auf ihre Wechselwirkung mit dem A $\beta$ (1-42)-Peptid untersucht.

Die A $\beta$ -Aggregation konnte mit dem Liganden Trimer-Säure **36** stärker gehemmt werden als mit dem Liganden Trimer **21**. Auffällig war dabei die Bildung vieler kleiner,  $\beta$ -faltblattreicher Aggregate. Da Trimer-Säure **36** unter den Versuchsbedingungen in ionischer Form vorlag, könnten die erhaltenen Resultate auf die Ausbildung zusätzlicher elektrostatischer Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Der ebenfalls ionisch vorliegende Ligand Amino-Trimer **35** zeigte im Thioflavin T-Test ähnliche Ergebnisse. Es ist daher zu erwarten, dass auch hier eine Destabilisierung der  $\beta$ -Faltblattstruktur erfolgt, was durch weitere Untersuchungen belegt werden muss. Die neuen Liganden mit den an den terminalen Enden auftretenden ionischen Strukturen verringern folglich die A $\beta$ -Aggregation.

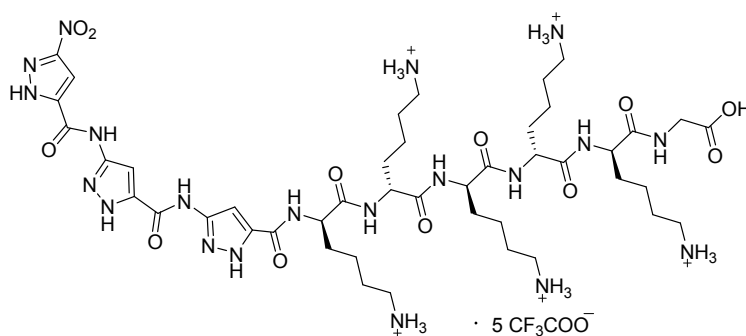
Die Verknüpfung kurzer Reste mit dem trimeren Pyrazolliganden führte zu den Verbindungen Trimer-Diamin **43**, Trimer-GABA **38** und Trimer-GABA-Säure **40**. Diese besitzen gegenüber Trimer **21** eine schwächer inhibierende Wirkung auf die A $\beta$ -Fibrillogenese. Eine mögliche Ursache für diese Effekte kann die unzureichende Kettenlänge sein, da die kurzkettingen Reste keine zusätzlichen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren-Seitenketten des A $\beta$ -Peptids eingehen können.

Weiterhin wurde die Struktur durch die Einführung flexibler Linker variiert, was zu den Verbindungen Trimer-TEG **55** und Trimer-TEG-Säure **62** führte. Beide Liganden zeigten den erwünschten Effekt auf die A $\beta$ -Aggregation indem sie die Bildung größerer Aggregate verstärkt hemmten. Es ist anzunehmen, dass der polare Linker zwischen beide Peptidstränge „interkaliert“ und im Bereich des  $\beta$ -Turns disperse Wechselwirkungen mit den unpolaren Aminosäuren-Seitenketten eingeht.

Einen starken Einfluss auf das Aggregationsverhalten des A $\beta$ -Peptids wiesen im Thioflavin T-Test lipophile Verbindungen auf. Durch die Einführung der sperrigen, lipophilen Cyclohexylringe wurden die inhibierenden und disaggregierenden Fähigkeiten dieser Liganden gegenüber dem Trimer **21** deutlich verbessert, da der Komplex durch zusätzliche hydrophobe und disperse Wechselwirkungen im unpolaren Bereich mit den Aminosäuren Ile (32) und Val (36) stabilisiert wird. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Entfernung des Cyclohexylrings von den Pyrazoleinheiten die aggregationshemmende Wirkung verstärkt wird.

Die Verknüpfung eines einzelnen Lysins (Trimer-Lysin **45**) an das Pyrazolgrundgerüst bewirkte eine Beschleunigung der Aggregation. Es wird angenommen, dass das Lysin einerseits als kosmotrop wirkend die Struktur des A $\beta$ -Peptids stabilisiert und andererseits inter- oder intramolekular eine Salzbrücke bildet, wodurch sich eine weitere Protofibrille nähern könnte.

Dagegen erwies sich die polykationische Verbindung Trimer-KKKKKG **59** (**Abbildung 86**) bezüglich ihrer inhibierenden Eigenschaften als potenteste Verbindung und war in der Lage zuvor hergestellte Fibrillen wieder aufzulösen. Dieser Ligand **59** bewirkte zudem eine deutliche Konformationsänderung. Eine mögliche Ursache für diesen starken Einfluss ist die Stabilisierung der „Glutamat-Leiter“ über Salzbrücken.



**Abb. 86:** Darstellung des Liganden Trimer-KKKKKG **59**.

Die dargelegten Erkenntnisse konnten in ersten, vorläufigen Molekül-Dynamik-Simulationen, die in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Sticht* berechnet wurden, weitestgehend bestätigt werden.

## 4.2 Ausblick

In dieser Promotionsarbeit wurden einige vielversprechende Liganden entwickelt, die in Thioflavin T-Tests eine Reduktion von  $\beta$ -Faltblattstrukturen in Lösung (toxische Oligomere) zeigten. Diese Liganden lösten auch bereits bestehende amyloide Fibrillen wieder auf.

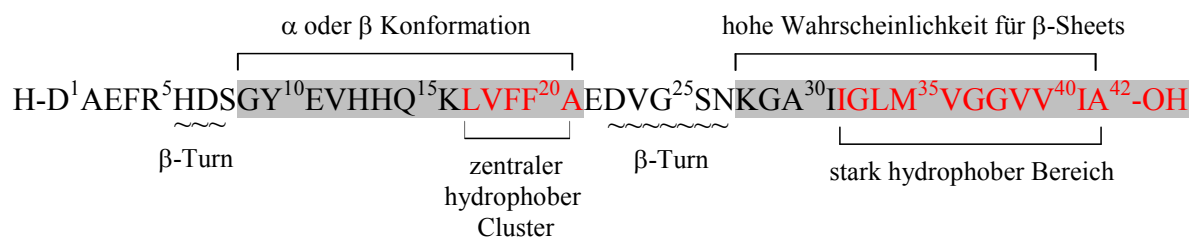
Um diese Ergebnisse zu untermauern und weitere Informationen über den Mechanismus der Peptid-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu erhalten, sollten im Anschluss an diese Arbeit weitere Untersuchungen mit diesen Liganden vorgenommen werden. Von Interesse sind hier vor allem die Verbindungen Trimer-KKKKKG **59**, Trimer-LPFFD **60**, Trimer-Lysin-Che **53** und Trimer-TEG-Che **58**, die sowohl in AUZ- als auch in FCS-Experimenten vermessen werden sollten.

Weiterhin sollten die Verbindungen mittels TEM-Messungen näher untersucht werden, da mit dem ThT-Assay nicht geklärt werden kann, ob eine erniedrigte Fluoreszenzintensität unmittelbar mit einer Hemmung der Fibrillenbildung zusammenhängt.<sup>[116]</sup>

Es wäre sinnvoll, Trimer-LPFFD **60** und Trimer-TEG-Che **58** mit polaren Gruppen zu funktionalisieren, um eine Wasserlöslichkeit zu gewährleisten. So könnten weitere Konformationsuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie durchgeführt werden.

Da in den CD-Experimenten mit Trimer-Lysin-Che **53** keine Komplexbildung mit den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin an Position 19 und 20) in dem A $\beta$ -Peptid zu beobachten war, sollten vor allem mit dieser Verbindung NMR- oder Fluoreszenztitrationen mit verschiedenen, sich überschneidenden  $\beta$ -faltblattreichen Sequenzabschnitten durchgeführt werden, die den Aggregationsprozess auslösen sollen. Hier wäre besonders die Region (28-42) interessant (**Abbildung 88**).





**Abb. 87:** Darstellung des Aβ(1-42)-Peptides. Es werden die Bereiche mit ihren angenommenen Konformationen gezeigt.<sup>[97]</sup>

Solche Untersuchungen könnten einerseits Aufschluss über den Mechanismus der Aggregation geben und andererseits zeigen, in welchem Bereich die Liganden mit entsprechender variierender Funktionalisierung bevorzugt mit dem Aβ-Peptid komplexieren. Die angenommene Hauptursache der AD, die Fibrillogenese, könnte so besser verstanden und darauf aufbauend könnten neue Verbindungen entwickelt werden.

#### 4.2.1 Weitere Untersuchungsmethoden

Zur Erlangung struktureller Informationen sollten generell Festkörper-NMR-Studien durchgeführt werden, bei denen über homo- und heteronukleare zweidimensionale Spektren Korrelationen zwischen den synthetischen Liganden und dem Aβ-Peptid festgestellt werden können. Damit können zum einen CH- $\pi$  Wechselwirkungen<sup>[203]</sup> detektiert und zum anderen  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Abstände<sup>[204,205]</sup> bestimmt werden. Anhand dieser Ergebnisse könnten die bisher postulierten Daten verifiziert werden.

Wasserstoff/Deuterium-Austauschtechniken können ebenfalls eingesetzt werden, um strukturelle Unterschiede zwischen Monomeren und größeren Aggregaten zu detektieren.<sup>[204]</sup> Dabei liefert die H/D-Austauschgeschwindigkeit Informationen über jene Segmente des Peptids, die aufgrund inter- oder intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen oder aus sterischen Gründen für den H/D-Austausch schwer zugänglich sind und folglich die quartäre Struktur der Fibrille ausbilden.<sup>[144]</sup>

Kürzlich wurde von *Feng et al.* beobachtet, dass kleine Moleküle Kolloide bilden und erst dadurch die Aβ-Fibrillogenese hemmen.<sup>[124]</sup> Mittels TEM-Aufnahmen und in AUZ-Messungen wurde festgestellt, dass einige der von uns synthetisierten Liganden selbst Aggregate bilden. Um weitere mechanistische und strukturelle Informationen zu gewinnen, wäre es interessant zu wissen, ob die von diesem Arbeitskreis synthetisierten Verbindungen

ebenfalls kolloidale Aggregate bilden und erst daraus resultierend die Fibrillenbildung inhibieren. Dieser Test kann im Labor mit einem ThT-Assay durchgeführt werden: Dabei wird in einem Ansatz mit A $\beta$  und dem zu untersuchenden Liganden ein Überschuss an BSA (*bovine serum albumin*) hinzugegeben, welches kolloidale Strukturen auflöst bzw. die Kolloidbildung unterbindet. Zeigen sich nun keine inhibierenden Effekte mehr, so kann davon ausgegangen werden, dass die Verbindung Kolloide bildet und erst dadurch effektiv die A $\beta$ -Aggregation hemmen kann.

Wie bereits erwähnt können ThT-Ergebnisse unter anderem dadurch verfälscht werden, dass die Verbindungen präzipitieren oder kompetitiv binden. Deshalb sollte künftig ein anderes Verfahren verwendet werden, um den hemmenden Einfluss der Liganden auf die Akkumulation des A $\beta$ -Peptides zu untersuchen. Ein Assay mit monoklonalen A $\beta$ -Antikörpern (IgG) wäre hierzu geeignet. Laut Literatur<sup>[177]</sup> sind die Vorteile dieses Testverfahrens folgende:

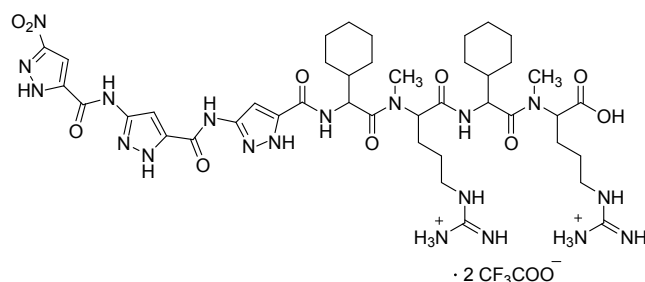
- Die Moleküle benötigen keine spezifischen spektroskopischen oder radiomarkierten Eigenschaften.
- Es können schnell Bibliotheken von kleinen Molekülen unter physiologischen Bedingungen überprüft werden.
- Die Assoziation der Verbindungen, die potentiell an unterschiedliche Stellen entlang der Fibrillenachse binden können, kann detektiert werden.
- Die durch die Moleküle bedeckte Oberfläche der Fibrillen kann prozentual abgeschätzt werden.

Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Grundlage, dass Moleküle die Interaktion zwischen A $\beta$ -Fibrillen und monoklonalen anti-A $\beta$ -IgG inhibieren. Mit der Durchführung dieses Assays kann schnell zwischen Liganden, die an A $\beta$ -Fibrillen binden und denen, die keinerlei Wechselwirkung mit dem Peptid zeigen, unterschieden werden.

#### 4.2.2 Strukturelle Optimierung

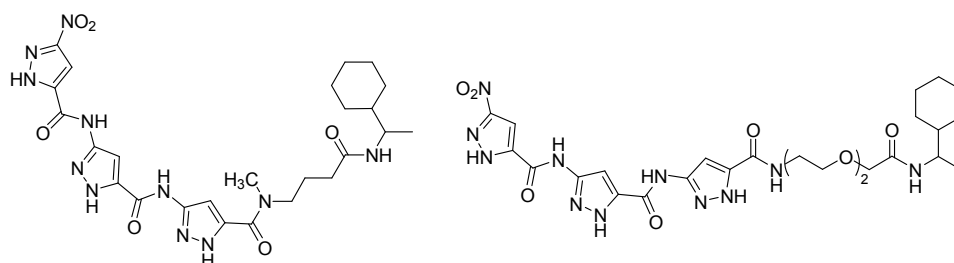
Prinzipiell können strukturelle Optimierungen vorgenommen werden. *Kokkoni et al.* zeigten, dass durch die Einführung bereits einer *N*-Methylgruppe in eine Peptidsequenz einerseits die Inhibierung signifikant verbessert wird und andererseits die Verbindungen wasserlöslich

werden.<sup>[116,206]</sup> Durch eine Kombination des trimeren Aminopyrazols mit lipophilen und *N*-methylierten Molekülen könnten weitere effiziente Liganden synthetisiert werden wie zum Beispiel Trimer-Chg-mArg-Chg-mArg **63** (**Abbildung 89**). Dabei wird zusätzlich mit der Aminosäure Arginin bzw. den Guanidiniumionen ein Element eingeführt, das als chaotrop wirkend Proteine und Peptide destabilisieren kann.<sup>[207,208]</sup>



**Abb. 88:** Struktur des Liganden Trimer-Chg-mArg-Chg-mArg **63**.

Da sich bei den lipophilen Liganden zeigte, dass sich mit zunehmender Entfernung des Cyclohexylrings von den Pyrazoleinheiten die inhibierende Wirkung verbessert, sollte die Linker-Länge variiert werden (**Abbildung 90**). Durch Untersuchung dieser Liganden und einem Vergleich mit den bereits synthetisierten Liganden können weitere mechanistische Informationen erhalten werden.



**Abb. 89:** Strukturvorschläge neuer  $\beta$ -Faltblattliganden.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Bitan* werden die synthetisierten Verbindungen derzeit auf ihre Toxizität untersucht. Sollten sich die  $\beta$ -Faltblattliganden als nicht toxisch erweisen und noch bei niedrigen Konzentrationen aktiv sein, so könnten sie unter Umständen zur klinischen Studie gebracht werden. Einige Forschungsgruppen stellten die Hypothese auf, dass eine Verkappung der aromatischen Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids die Agglomeration kleiner Oligomere inhibiert<sup>[209-211]</sup> und dadurch die Bildung der toxischen A $\beta$ -

Oligomere verhindert wird. Dies stellt einen vielversprechender Therapieansatz dar. Nach dieser Hypothese könnten einige der synthetisierten Verbindungen als Therapeutikum in Frage kommen, da sie die aromatischen Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids erkennen und mit diesen in Wechselwirkung treten. Ein beträchtlicher Vorteil gegenüber einigen kleinen Molekülen, die sich zurzeit in den klinischen Phasen befinden, wäre das Wissen über die Wirkungsweise dieser Liganden auf das A $\beta$ -Peptid.

Sollten die Liganden toxisch sein, so sollte in Zukunft der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Mechanismus der Peptid-Ligand-Wechselwirkung auf molekularer Ebene liegen. Das Wissen hierüber wäre ein enormer Fortschritt für die Entwicklung neuer, effektiver Therapeutika.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Acros Organics* (Geel, Belgien), *Aldrich Chemical Co.* (Taufkirchen, Deutschland), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz) und *Fluka* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und falls nicht anders angegeben in der erhaltenen Qualität eingesetzt.

#### 5.1.2 Lösungsmittel

Die eingesetzten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach bekannten Standardmethoden absolutiert.<sup>[212,213]</sup> Das benutzte Wasser war entionisiert und wurde im Bedarfsfall nochmals über eine Purelab UHQ Anlage (ELGA Berkefeld GmbH, Celle) entionisiert.

#### 5.1.3 Chromatographische Methoden

##### Dünnschichtchromatographie (DC):

Bei allen dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrollen dienten Kieselgel-Platten (Polygram<sup>®</sup> SILG/UV<sub>254</sub> bzw. Alugram<sup>®</sup> SILG/UV<sub>254</sub>) der Firma *Roth* als stationäre Phase. Dabei erfolgte die Detektion im UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm. Bei der DC-Plattentrennung wurden Kieselgel-Glasplatten 60 F<sub>254</sub> mit Konzentrierungszone der Firma *Merck* benutzt. Um die Produkte zu isolieren, wurden die im UV-Licht sichtbaren Zonen markiert, mit einem Skalpell entfernt und die jeweilige Verbindung im entsprechenden Lösungsmittel gelöst.

Sprühreagenzien:

Die DC-Platten wurden zum einen mit einer Ninhydrin-Lösung<sup>[212]</sup> und zum anderen mit einer CAM-Lösung, die nach Literatur [214] hergestellt wurde, besprüht.

Säulenchromatographie (SC):

Hierzu wurde Kieselgel 60 der Firma *Fluka* der Porengröße 0.063-0.2 mm verwendet. Die Säulen wurden jeweils nass befüllt.

5.1.4 Schmelzpunktbestimmung

Die Ermittlung der Schmelzpunkte wurde mit einem *Büchi* Melting Point B-540 durchgeführt. Die Werte sind nicht korrigiert.

5.1.5 Spektroskopische MethodenNMR-Spektroskopie

Die <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit den Spektrometern Bruker Avance 300 bzw. Bruker Avance 500 mit den Frequenzen 300 MHz bzw. 500 MHz der Firma *Bruker* (Karlsruhe, Deutschland) gemessen. Die Angaben der chemischen Verschiebung erfolgt nach der  $\delta$ -Skala in ppm. Als interner Standard verwendet man Tetramethylsilan (TMS) bezüglich der deuterierten Lösungsmittel (Chloroform bzw. Dimethylsulfoxid). Alle Kopplungskonstanten (*J*) sind in Hertz (Hz) angegeben; dabei werden ihre Spinmultiplizitäten wie folgt abgekürzt:

s	=	Singulett
bs	=	breites Singulett
d	=	Dublett
dd	=	Dublett vom Dublett
t	=	Triplett
q	=	Quartett
m	=	Multipllett

Zur genaueren Strukturaufklärung wurden folgende 2D-NMR-Spektren<sup>[215,216]</sup> aufgenommen:

#### H,H-COSY (Correlated Spectroscopy):

Das homonuklear (H,H)-korrelierte 2D-NMR-Experiment liefert Spektren, bei denen auf beiden Frequenzachsen die  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen miteinander korreliert sind.<sup>[217]</sup> Dabei erscheinen die Korrelationspeaks, wenn eine Spinkopplung vorhanden ist, also die gekoppelten Protonenpaare detektiert werden.

#### HMQC (Heteronuclear multiple quantum coherence):

Dieses Experiment beschreibt die einfachste Form einer inversen H,X-Korrelationstechnik. Dabei werden unerwünschte Hauptsignale, Signale der Protonen, die an  $^{12}\text{C}$  gebunden sind, durch einen Phasenzyklus unterdrückt. Die Spektren geben Informationen über die Korrelation zwischen Protonen und Kohlenstoffkernen via  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten.

#### HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation):

Das HMBC-Verfahren ist ein von Bax und Summers<sup>[218]</sup> entwickeltes Experiment, bei dem eine Zuordnung auch dann möglich ist, wenn  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Kerne über zwei oder drei Bindungen hinweg koppeln ( $^2\text{J}(\text{C},\text{H})$  bzw.  $^3\text{J}(\text{C},\text{H})$ ).

#### Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer BioTOF III der Firma *Bruker* aufgenommen.

#### Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Die Anfertigung der CD-Spektren erfolgte mit einem J-810 Spektropolarimeter der Firma *Jasco*.

#### Fluoreszenzspektroskopie (ThT Messungen)

Die Thioflavin T (ThT) Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Spektrofluorometer InfiniTe 200 (*Tecan GmbH*, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt.

### 5.1.6 Verwendete Puffer

#### Kaliumphosphat-Puffer

0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Diese beiden Lösungen wurden gegeneinander auf den gewünschten pH-Wert von 7.20 titriert.

#### PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*)

137 mM     $\text{NaCl}$

2.70 mM     $\text{KCl}$

1.40 mM     $\text{KH}_2\text{PO}_4$

4.30 mM     $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

pH = 7.3

### 5.1.7 Molecular Modelling

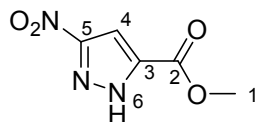
Kraftfeldrechnungen wurden mit dem Programm MacroModel 8.0 der Firma Schroedinger durchgeführt. Dabei wurden die Komplex-Strukturen mit dem Kraftfeld OPLS-2005 mit jeweils 1500 Schritten in Wasser minimiert.



## 5.2 Synthese

### 5.2.1 Synthese des Trimers **21**

#### Darstellung von 3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **30**

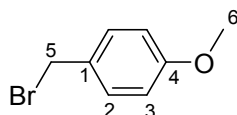


10.00 g 3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **22** (63.66 mmol, 1.00 eq) wurden in 250 mL trockenem Methanol gelöst. Durch die hellgelbe Reaktionslösung wurde fünf Minuten lang  $\text{HCl}_{(\text{gas})}$  geleitet. Nachdem das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet wurde, konnte Substanz **30** in quantitativer Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.01 (s, 3H, H-1), 7.41 (s, 1H, H-4). **Schmp.:** 138 °C.

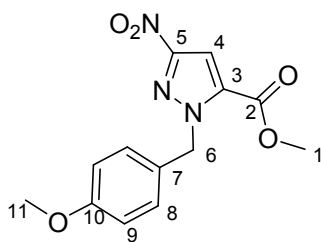
Das Spektrum stimmt mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

#### Darstellung von 4-Methoxybenzylbromid **64**



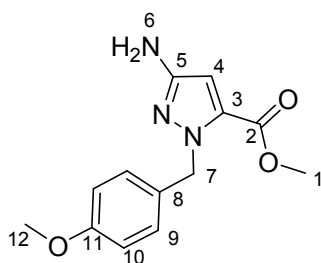
12.5 mL 4-Methoxybenzylalkohol (100.25 mmol, 1.00 eq) wurden in 150 mL Diethylether gelöst. Diese Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit 40 mL Bromwasserstoff (48 %ig in Wasser) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 100 mL gesättigte Natriumbromid-Lösung zugegeben. Nach der Trennung der Phasen wurde die organische Phase zunächst über Kaliumcarbonat und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration des Trocknungsmittels wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt, und es verblieben 17.80 g (88.53 mmol, 88 %) eines farblosen Öls **64**.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.81 (s, 3H, H-6), 4.52 (s, 2H, H-5), 6.88 (d,  $^3J = 8.7$  Hz, 2H, H-3), 7.34 (d,  $^3J = 8.7$  Hz, 2H, H-2). Das Spektrum stimmt mit der Literatur überein.<sup>[219]</sup>

Darstellung von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **23**

Unter Argonatmosphäre wurden 2.00 g 3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **30** (11.69 mmol, 1.00 eq) in absolutem DMF (35 mL) gelöst. Nach Zugabe von 3.53 g 4-Methoxybenzylbromid **64** (17.56 mmol, 1.50 eq) und 3.23 g Kaliumcarbonat (23.37 mmol, 2.00 eq) wurde die Suspension 30 Minuten bei Raumtemperatur und weitere 18 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch mit 1 M HCl auf pH = 1 angesäuert und viermal mit je 35 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Membranvakuum unter vermindertem Druck eingengt. Das Produkt kristallisierte als farblose Substanz **23** über Nacht bei 8 °C aus.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.78 (s, 3H, H-11), 3.92 (s, 3H, H-1), 5.77 (s, 2H, H-6), 6.82-6.88 (m, 2H, H-9), 7.31-7.37 (m, 2H, H-8), 7.39 (s, 1H, H-4). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 52.7 (C-1), 55.2 (C-11), 55.9 (C-6), 107.6 (C-4), 114.0 (C-9), 126.9 (C-7), 129.7 (C-8), 133.8 (C-3), 154.1 (C-5), 158.5 (C-2), 159.7 (C-10). **Schmp.**: 73 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.74 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. Dies Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Synthese von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **24**

In 120 mL Methanol und 40 mL Tetrahydrofuran wurden 2.15 g des Monomerbausteins **23** (7.38 mmol, 1.00 eq) gelöst, mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (10 mol%) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre 16 Stunden gerührt. Nach Filtration des Katalysators über Kieselgur wurde das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck

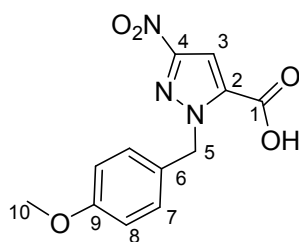
entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1) gereinigt. Als hellgelber Feststoff konnte das Produkt **24** mit einer Ausbeute von 87 % (1.68 g, 6.43 mmol) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.65 (brs, 2H, H-6), 3.77 (s, 3H, H-12), 3.83 (s, 3H, H-1), 5.50 (s, 2H, H-7), 6.16 (s, 1H, H-4), 6.79-6.86 (m, 2H, H-10), 7.18-7.24 (m, 2H, H-9).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 51.8 (C-1), 53.4 (C-7), 55.2 (C-12), 98.0 (C-4), 113.8 (C-10), 128.8 (C-9), 129.6 (C-8), 132.2 (C-3), 153.0 (C-5), 159.0 (C-11), 160.0 (C-2).

**Schmp.:** 93 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.1 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

### Synthese von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **25**



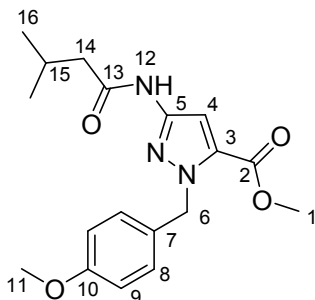
6.00 g der Substanz **23** (20.60 mmol, 1.00 eq) wurden in 65 mL Methanol und 65 mL Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 13 mL Wasser und 0.55 g Lithiumhydroxid (22.96 mmol, 1.11 eq) wurde das Reaktionsgemisch 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der gelblich ölige Rückstand in Wasser aufgenommen. Unter Rühren wurde die Lösung auf pH = 1 angesäuert. Der ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert, mit 1 M HCl gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 5.53 g (19.95 mmol, 97 %) des farblosen Feststoffs **25** isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.72 (s, 3H, H-10), 5.75 (s, 2H, H-5), 6.89-6.92 (m, 2H, H-8), 7.22-7.25 (m, 2H, H-7), 7.50 (s, 1H, H-3). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  [ppm] = 54.9 (C-5), 55.0 (C-10), 107.1 (C-3), 114.0 (C-8), 127.7 (C-6), 129.3 (C-7), 135.7 (C-2), 153.6 (C-4), 159.0 (C-9), 159.2 (C-1). **Schmp.:** 139 °C. Die Spektren stimmen mit der

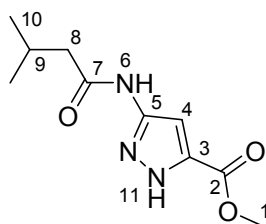
Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(3-methylbutanamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **65**



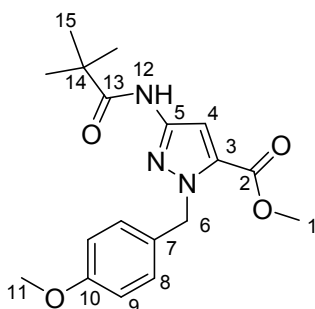
400 mg *N-p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **24** (1.53 mmol, 1.00 eq) wurden in 40 mL absolutem Dichlormethan gelöst und eine Spatelspitze *N,N*-4-Dimethylaminopyridin und 0.25 mL Triethylamin (1.81 mmol, 1.18 eq) hinzugefügt. Nachfolgend wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und tropfenweise 0.22 mL Isovaleriansäurechlorid (1.76 mmol, 1.15 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde gerührt. Mit je 20 mL 0.6 M Natronlauge wurde das organische Lösungsmittel zweimal extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan/Methanol 150:1). Anschließende Trocknung im Hochvakuum erbrachten 508 mg der Verbindung **65** (1.47 mmol, 96 %) als farblosen Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.99 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 6H, H-16), 2.19 (2s, 3H, H-14, H-15), 3.77 (s, 3H, H-11), 3.86 (s, 3H, H-1), 5.58 (s, 2H, H-6), 6.81-6.84 (m, 2H, H-9), 7.19-7.22 (m, 2H, H-8), 7.28 (s, 1H, H-4), 7.73 (brs, 1H, H-12). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 22.4 (C-16), 26.1 (C-15), 46.3 (C-14), 52.0 (C-1), 53.8 (C-6), 55.2 (C-11), 102.4 (C-4), 114.0 (C-9), 128.9 (C-7), 129.1 (C-8), 132.0 (C-3), 145.6 (C-5), 159.2 (C-10), 160.0 (C-2), 169.9 (C-13). **Schmp.**: 116.2-117.8 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.73 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>H: ber.: 346.1761; gef.: 346.1807; C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na: ber.: 368.1581, gef.: 368.1617.

Synthese von 3-(3-Methylbutanamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **66**

300 mg 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(3-methylbutanamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **65** (0.87 mmol, 1.00 eq) wurden in 20 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der grüne Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1) gereinigt. Dabei konnten 207 mg der farblosen Substanz **66** (0.81 mmol, 93 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 6H, H-10), 2.01-2.08 (m, 1H, H-9), 2.18 (d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, H-8), 3.83 (s, 3H, H-1), 7.01 (s, 1H, H-4), 10.51 (brs, 1H, H-6), 13.52 (brs, 1H, H-11). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 22.2 (C-10), 25.4 (C-9), 44.5 (C-8), 51.9 (C-1), 99.4 (C-4), 132.5 (C-3), 147.9 (C-5), 159.3 (C-2), 170.1 (C-7). **Schmp.**: 166.5-168.3 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.21 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>H: ber.: 226.1186; gef.: 226.1199; C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na: ber.: 248.1006, gef.: 248.1014; C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Na: ber.: 473.2119, gef.: 473.2151.

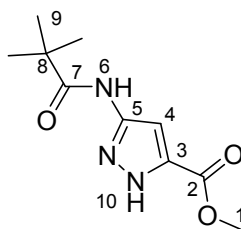
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-pivalamido-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **67**

Unter Argon wurden 400 mg des Monomer-Amins **24** (1.53 mmol, 1.00 eq) in 40 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Danach wurden eine Spatelspitze *N,N*-4-Dimethylaminopyridin und 0.25 mL Triethylamin (1.81 mmol, 1.18 eq) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 0.22 mL Pivalinsäurechlorid (1.76 mmol, 1.15 eq) hinzutropft. Nach Entfernung des Eisbades wurde das Gemisch eine Stunde bei

Raumtemperatur gerührt und die organische Phase zweimal mit je 20 mL 0.6 M Natronlauge extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Das verbleibende, gelbe Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 150:1) gereinigt. Es konnte das gewünschte Produkt **67** (474 mg, 1.37 mmol) konnte als farbloses Öl in 90 %iger Ausbeute erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.28 (s, 9H, H-15), 3.77 (s, 3H, H-11), 3.85 (s, 3H, H-1), 5.59 (s, 2H, H-6), 6.82-6.85 (m, 2H, H-9), 7.19-7.22 (m, 2H, H-8), 7.31 (s, 1H, H-4), 7.91 (brs, 1H, H-12). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 27.4 (C-15), 39.3 (C-14), 52.0 (C-1), 53.8 (C-6), 55.2 (C-11), 102.5 (C-4), 114.0 (C-9), 128.9 (C-7), 129.0 (C-8), 132.1 (C-3), 146.0 (C-5), 159.2 (C-10), 160.0 (C-2), 175.9 (C-13). **R<sub>f</sub>**: 0.82 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>H: ber.: 346.1761; gef.: 346.1804.

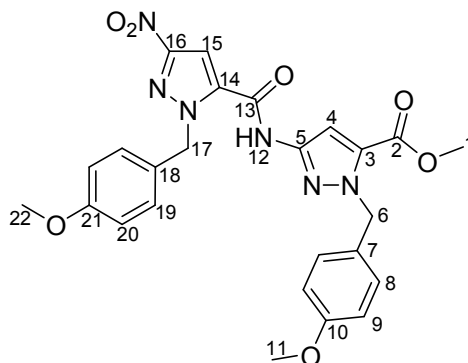
#### Synthese von 3-Pivalamido-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **68**



In 20 mL absoluter Trifluoressigsäure wurden 320 mg der Verbindung **67** (0.93 mmol, 1.00 eq) gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ockerfarbene Feststoff säulenchromatographisch an Kieselgel mit Pentan/Essigsäureethylester 1:1 gereinigt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 224 mg des gewünschten Produkts **68** (0.88 mmol, 95 %) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.20 (s, 9H, H-9), 3.83 (s, 3H, H-1), 6.99 (s, 1H, H-4), 10.06 (brs, 1H, H-6), 13.54 (brs, 1H, H-10). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 26.9 (C-9), 51.9 (C-1), 59.7 (C-8), 99.9 (C-4), 132.4 (C-3), 148.2 (C-5), 159.2 (C-2), 175.9 (C-7). **Schmp.**: 133-134 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.34 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>H: ber.: 226.1186; gef.: 226.1202; C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na: ber.: 248.1006, gef.: 248.1018; C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Na: ber.: 473.2119, gef.: 473.2146.

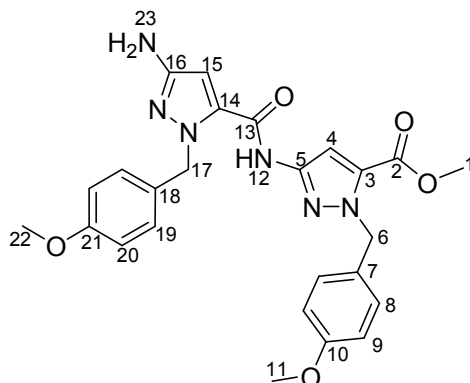
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-carbonsäuremethylester **26**



Unter Argonatmosphäre wurden 2.50 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **24** (9.57 mmol, 1.00 eq) und 2.92 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **25** (10.53 mmol, 1.10 eq) in 150 mL absolutem Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10.49 g PyClop (24.88 mmol, 2.60 eq) und tropfenweise 13.30 mL DIEA (76.55 mmol, 8.00 eq) gegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Membranpumpenvakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1) gereinigt. Als farbloser Feststoff konnte Verbindung **26** in 86 %iger Ausbeute (4.27 g, 8.20 mmol) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.76 (s, 3H, H-22), 3.77 (s, 3H, H-11), 3.91 (s, 3H, H-1), 5.60 (s, 2H, H-6), 5.80 (s, 2H, H-17), 6.81-6.83 (m, 4H, H-9, H-20), 7.19 (s, 1H, H-15), 7.21-7.24 (m, 2H, H-8), 7.34 (s, 1H, H-4), 7.35-7.39 (m, 2H, H-19), 8.30 (brs, 1H, H-12). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 52.2 (C-1), 54.1 (C-6), 55.2 (C-11, C-22), 55.9 (C-17), 102.7 (C-4), 103.2 (C-15), 114.0 (C-9), 114.1 (C-20), 127.1 (C-18), 128.5 (C-7), 129.3 (C-8), 130.0 (C-19), 132.4 (C-3), 136.3 (C-14), 144.3 (C-5), 154.1 (C-16), 154.9 (C-13), 159.4 (C-10), 159.7 (C-2), 159.8 (C-21). **Schmp.:** 69 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.76 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1, 0.25 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Synthese von 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **27**

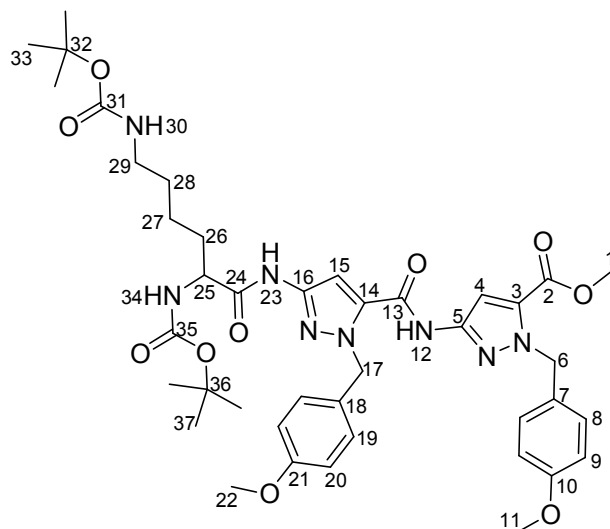


3.03 g des dimeren Pyrazolbausteins **26** (5.82 mmol, 1.00 eq) wurden in 30 mL Tetrahydrofuran und 90 mL Methanol gelöst. Anschließend wurde eine katalytische Menge Palladium-Aktivkohle (10 mol%) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 14 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Reaktionsende wurde der Katalysator über Kieselgur entfernt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingeeengt. Das über Nacht ausfallende Produkt **27** konnte nach Trocknung im Hochvakuum in Form farbloser Kristalle in 90 %iger Ausbeute (2.57 g, 5.24 mmol) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.68 (brs, 2H, H-23), 3.76 (s, 3H, H-11), 3.77 (s, 3H, H-22), 3.88 (s, 3H, H-1), 5.53 (s, 2H, H-17), 5.61 (s, 2H, H-6), 5.94 (s, 1H, H-15), 6.80-6.85 (m, 4H, H-9, H-20), 7.21-7.26 (m, 4H, H-8, H-19), 7.35 (s, 1H, H-4), 8.10 (brs, 1H, H-12). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 52.1 (C-1), 53.3 (C-17), 53.9 (C-6), 55.2 (C-11, C-22), 93.8 (C-15), 102.7 (C-4), 113.9 (C-9), 114.0 (C-20), 128.8 (C-18), 129.1 (C-8, C-19), 129.7 (C-7), 132.2 (C-3), 134.9 (C-14), 145.1 (C-5), 153.0 (C-16), 156.7 (C-13), 159.0 (C-10), 159.3 (C-21), 159.9 (C-2). **Schmp.:** 136.9-139.0 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.14, in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>



Darstellung von 3-(3-(2,6-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)lysiny)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-carbonsäuremethylester **69**

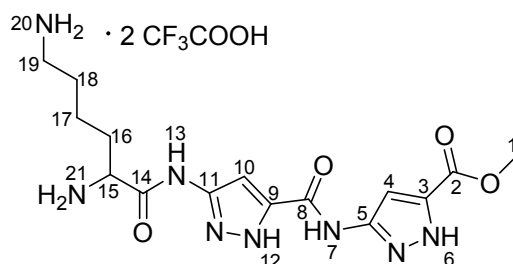


Unter Schutzgasatmosphäre wurden 199 mg Boc-Lys(Boc)-OH · DCHA (0.38 mmol, 1.12 eq) in 4.50 mL Dichlormethan und 1.50 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionslösung wurde unter Eiskühlung mit 147 mg Cl-HOBt (0.86 mmol, 2.75 eq), 146 mg HCTU (0.35 mmol, 1.12 eq) und 0.18 mL 2,6-Lutidin (1.55 mmol, 4.92 eq) versetzt und zehn min voraktiviert. Anschließend wurden 154 mg des C-terminal geschützten Pyrazolbausteins **27** (0.31 mmol, 1.00 eq) in wenig desgleichen Lösungsmittelgemisches gelöst und zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nach Entfernung des Eisbades wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/Essigsäureethylester 2:1) gereinigt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 146 mg des gewünschten Produkts **69** (0.18 mmol, 57 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.22-1.37 (m, 22H,  $\text{CH}_2$ , H-33, H-37), 1.52-1.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.82-2.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.70-3.71 (2s, 6H, H-11, H-22), 3.85 (s, 3H, H-1), 3.99-4.04 (m, 1H, H-25), 5.58 (bs, 4H, H-6, H-17), 6.76 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H, H-30), 6.85-6.91 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.95 (d,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, H-34), 7.15-7.19 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.47 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 10.57 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.33 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ). **<sup>13</sup>C-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.7, 28.3, 28.4, 29.6, 38.6, 39.8, 52.0, 53.7, 53.9, 55.2, 98.9, 102.9, 113.9, 128.9, 129.2, 129.3, 131.9, 134.5, 145.2, 156.2, 156.7, 159.1, 159.2, 159.9, 170.4. **Schmp.:**

103 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.43 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1, 0.08 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 2:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na: ber.: 841.3861; gef.: 841.3942.

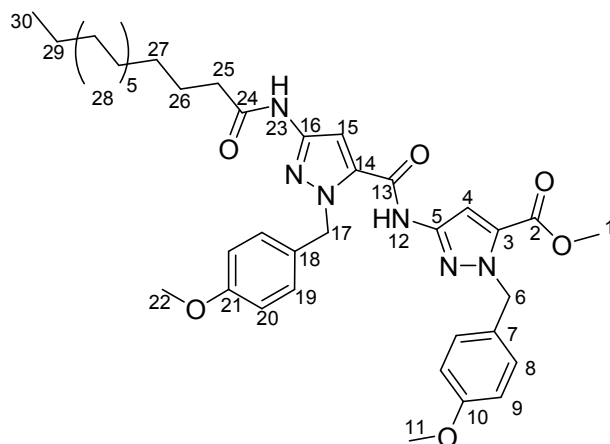
Synthese von 3-(3-(2,6-Diaminohexanamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat **70**



55 mg der Verbindung **69** (67 µmol, 1.00 eq) wurden unter Argon in 3 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung vorsichtig mit absolutem Diethylether versetzt. Der farblos ausfallende Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. In 54 %iger Ausbeute konnte die Substanz **70** als Trifluoracetatsalz (22 mg, 36 µmol) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.34-4.41 (m, 2H, H-17), 1.53-1.59 (m, 2H, H-18), 1.79-1.82 (m, 2H, H-16), 2.77 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-19), 3.85 (s, 3H, H-1), 3.95 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, H-15), 7.11 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.52 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.83 (bs, 3H, <sup>+</sup>NH<sub>3</sub>), 8.29 (bs, 3H, <sup>+</sup>NH<sub>3</sub>), 11.13 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.24 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.44 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.76 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 21.2, 26.5, 30.4, 38.4, 52.0, 52.3, 97.4, 100.3, 116.0, 118.4, 132.8, 136.3, 146.5, 147.1, 156.4, 157.9, 158.2, 159.2, 166.5. **Schmp.**: Zersetzung ab 228 °C. **HRMS (ESI)**: für C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>H: ber.: 379.1837; gef.: 379.1842.

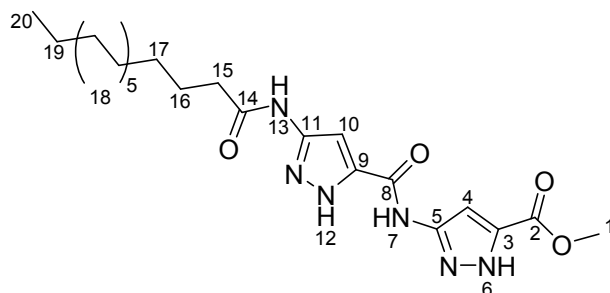
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-palmitamido-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **71**



109 mg Palmitinsäure (0.43 mmol, 1.03 eq) wurden in einem Gemisch aus absolutem Dichlormethan/DMF im Verhältnis 3:1 (6 mL) vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde mit 174 mg Cl-HOBt (1.03 mmol, 2.50 eq), 170 mg HCTU (0.41 mmol, 1.00 eq) und 0.14 mL 2,6-Lutidin (1.20 mmol, 3.00 eq) versetzt und zehn Minuten unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wurden 200 mg des dimeren Aminopyrazol-Bausteins **27** (0.41  $\mu$ mol, 1.00 eq), gelöst in dem gleichen Lösungsmittelgemisch (2 mL), hinzu getropft. Nach Entfernung des Eisbades wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die organische Phase mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte über Magnesiumsulfat. Nachfolgende Entfernung des Lösungsmittels und säulenchromatographische Reinigung (*n*-Pentan/Ethylacetat 3:1) erbrachte eine Ausbeute von 54 % (162 mg, 0.22 mmol) des gewünschten Produkts **71**.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.82-0.86 (m, 3H, H-30), 1.21-1.28 (m, 24H, H-27, H-28, H-29), 1.52-1.57 (m, 2H, H-26), 2.26 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2H, H-25), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, H-1), 5.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 5.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 6.84-6.98 (m, 4H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.10-7.15 (m, 5H, CH<sub>Aromat</sub>, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.51 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 10.50 (s, 1H, NH), 11.30 (s, 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.8, 22.0, 25.0, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 28.9, 29.0, 31.2, 35.4, 52.1, 52.8, 53.2, 54.9, 55.0, 96.7, 99.9, 102.9, 113.7, 113.8, 128.7, 128.8, 129.0, 129.7, 131.1, 133.7, 145.6, 146.0, 157.3, 158.5, 158.7, 159.3, 170.4. **Schmp.**: 115.3 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.88 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1, 0.21 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>H: ber.: 729.4334; gef.: 729.4338; für C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Na: ber.: 751.4154; gef.: 751.4154.

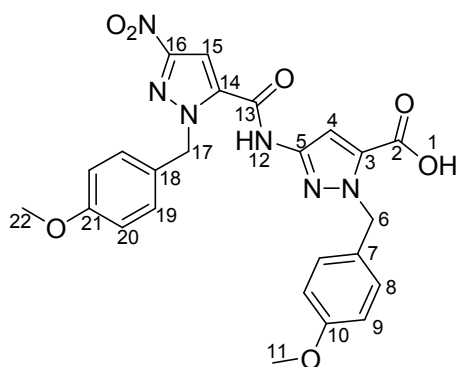
Synthese von 3-(3-Palmitamido-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **72**



Unter Schutzgas wurden 60 mg 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-palmitamido-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **71** (82  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in 3.40 mL trockener Trifluoressigsäure gelöst und fünf Stunden auf 70 °C erwärmt. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Produkt langsam mit kaltem, absolutem Diethylether ausgefällt. Der farblose Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es verblieben 31 mg der Substanz **72** (63  $\mu\text{mol}$ , 77%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.84 (t,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H, H-20), 1.21-1.30 (m, 24H, H-17, H-18, H-19), 1.55-1.59 (m, 2H, H-16), 2.29 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, H-15), 3.84 (s, 3H, H-1), 6.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.27 (brs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 10.47 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.00 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.8, 22.0, 25.0, 28.6, 28.7, 28.9, 31.2, 35.4, 51.8, 96.7, 99.2, 160.0, 170.5. **Schmp.**: ab 260 °C Zersetzung. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ : ber.: 511.3003; gef.: 511.3022.

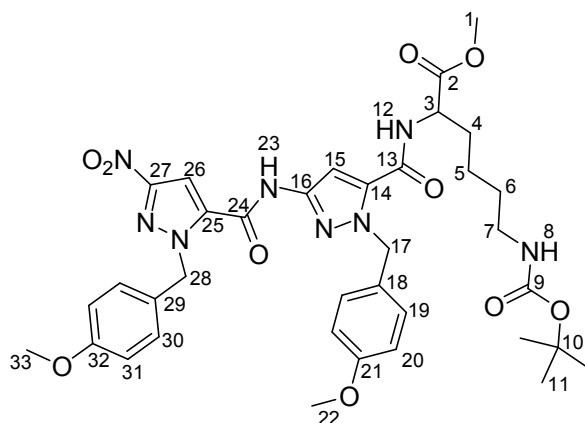
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **28**



1.00 g der Substanz **26** (1.92 mmol, 1.00 eq) wurden in einem Gemisch aus Methanol (6.50 mL) und Tetrahydrofuran (6.50 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 96.60 mg Lithiumhydroxid (4.03 mmol, 2.10 eq) und 1.30 mL Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der gelbe, ölige Rückstand in Wasser aufgenommen und unter starkem Rühren mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Nach Filtration des ausfallenden Niederschlags und Trocknung im Hochvakuum verblieben 0.88 g (1.74 mmol, 90 %) der gewünschten Verbindung **28** als farbloser Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.71 (2s, 6H, H-11, H-22), 5.61 (s, 2H, H-6), 5.79 (s, 2H, H-17), 6.86-6.92 (m, 4H, H-9, H-20), 7.12-7.19 (m, 3H, H-8, H-19, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.23-7.30 (m, 2H, H-8, H-19), 7.97 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.56 (brs, 1H, H-12), 13.62 (brs, 1H, H-1). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 53.1 (C-6, C-17), 55.0 (C-11, C-22), 102.8 (C-4), 105.1 (C-15), 113.8 (C-9), 114.0 (C-20), 127.8 (C-18), 128.7 (C-8), 129.2 (C-7), 129.4 (C-19), 132.7 (C-3), 136.6 (C-14), 145.0 (C-5), 153.5 (C-16), 155.5 (C-13), 158.7 (C-10), 159.0 (C-2), 160.3 (C-21). **Schmp.**: 216 °C. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*-butyloxycarbonyl)-lysine-carbonsäuremethylester **73**

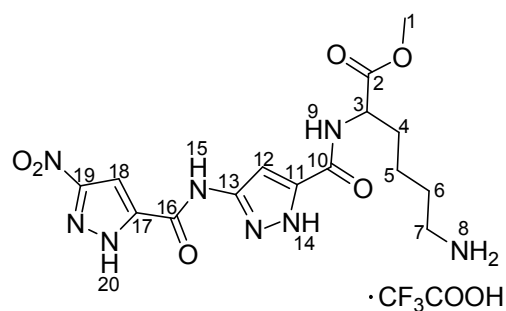


200 mg des dimeren Pyrazol-Bausteins **28** (0.39 mmol, 1.00 eq) wurden in 35 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0.21 mL DIEA (1.21 mmol, 3.06 eq) klarte die anfangs trübe Lösung auf. Anschließend wurden 121 mg 2-Chloro-1-methyl-pyridiniumiodid (0.47 mmol, 1.20 eq) hinzugefügt. Nachdem das Mukaiyama-Reagenz vollständig in Lösung gegangen war, wurden 117 mg *N*-Amino-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(S)-lysine-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (0.39 mmol, 1.00 eq) dazugegeben. Die gelbe

Reaktionslösung wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die organische Phase jeweils dreimal mit 1 M HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde über einer mit Kieselgel befüllten Säule (Pentan/Ethylacetat 1:1) säulenchromatographisch gereinigt. Verbindung **73** (226 mg, 0.30 mmol) wurde in Form eines farblosen Feststoffs in 77 %iger Ausbeute erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.23-1.37 (m, 13H, H-11, CH<sub>2</sub>), 1.75-1.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.87-2.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.65-3.71 (3s, 6H, H-1, H-22, H-33), 3.85 (s, 3H, H-1), 4.37-4.40 (m, 1H, H-3), 5.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 5.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 6.79 (t, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 1H, H-8), 6.85-6.92 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Benzy), 7.16-7.19 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Benzy), 7.45 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.72 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 6.95 (d, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 1H, H-12), 11.38 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 21.0, 28.3, 28.4, 29.6, 30.9, 51.9, 52.6, 53.7, 53.9, 55.0, 55.8, 56.0, 98.9, 102.9, 113.9, 128.9, 129.2, 129.3, 131.9, 134.5, 145.2, 156.2, 156.7, 159.1, 159.2, 159.9, 170.4. **Schmp.**: 151-155 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.45 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>Na: ber.: 771.3073; gef.: 771.3110.

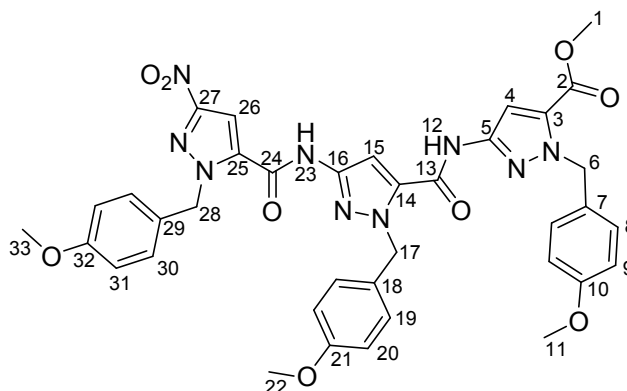
Synthese von *N*<sup>6</sup>-Amino-2-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-lysiny-carbonsäuremethylester-trifluoacetat **74**



Unter Argon wurden 60 mg der Verbindung **73** (80  $\mu$ mol, 1.00 eq) in 3.40 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für sieben Stunden bei 70 °C gerührt. Die braun gefärbte Reaktionslösung wurde für weitere 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und langsam mit kaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende Niederschlag wurde filtriert und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 37 mg des gewünschten Produkts **74** (71  $\mu$ mol, 88 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.38-1.43 (m, 2H, H-5), 1.50-1.61 (m, 2H, H-6), 1.74-1.87 (m, 2H, H-4), 2.78-2.80 (m, 2H, H-7), 3.67 (s, 3H, H-1), 4.41-4.45 (m, 1H, H-3), 7.42 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.70 (bs, 3-H, H-8), 7.94 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.92 (d, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, H-9), 11.41 (bs, 1H, H-15), 13.38 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 14.94 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 22.5, 26.4, 29.8, 38.6, 51.9, 97.6, 102.3, 136.2, 136.4, 138.7, 146.3, 155.0, 158.0, 172.3. **Schmp.:** ab 175 °C Zersetzung. **HRMS (ESI):** für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>H: ber.: 409.1579; gef.: 409.1583.

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **29**

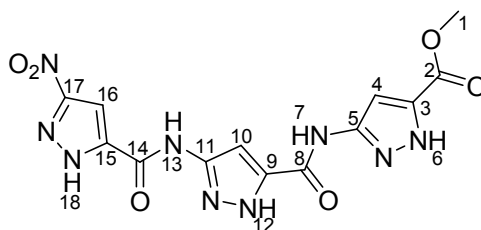


Unter Argon wurden 1.18 g 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **27** (2.41 mmol, 1.00 eq) und 0.78 g *N-p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **25** (2.81 mmol, 1.17 eq) in absolutem Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 2.64 g PyClop (6.26 mmol, 2.60 eq) und 3.35 mL DIEA (19.25 mmol, 8.00 eq) wurde die Lösung für zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand über einer mit Kieselgel befüllten Säule (*n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1) säulenchromatographisch gereinigt. Verbindung **29** konnte in Form eines farblosen Feststoffs in 82 %iger Ausbeute (1.48 g, 1.97 mmol) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.70-3.72 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 3.85 (s, 3H, H-1), 5.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.86-6.91 (m, 6H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.17-7.22 (m, 5H, CH<sub>Pyrazol</sub>, CH<sub>Aromat</sub>), 7.26-7.29 (m, 2H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.72 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.98 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.44 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.52 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 52.2, 53.2, 54.9, 55.0, 59.7, 100.9, 102.9, 105.0, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 128.8, 129.0, 129.3, 129.4, 131.2, 134.1, 136.7, 144.8, 145.6, 153.5, 155.4, 157.0, 158.6, 158.7, 159.0, 159.3, 192.0. **Schmp.**: 210.0-211.3 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.72 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1, 0.18 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 3:1. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_9\text{O}_9$ : ber.: 748.2485; gef.: 748.2473; für  $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9\text{Na}$ : ber.: 772.2450; gef.: 772.2450; für  $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9\text{H}$ : ber.: 750.2631; gef.: 750.2652; für  $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9\text{K}$ : ber.: 788.2189; gef.: 788.2220. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **21**



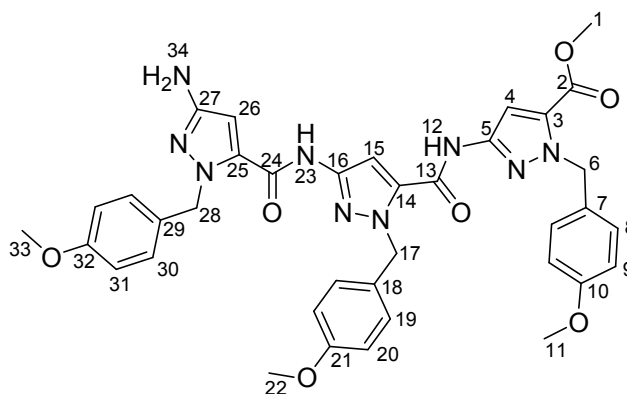
50 mg des PMB-geschützten trimeren Pyrazolbausteins **29** (67  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden unter Argon in 3 mL trockener Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene, farblose Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 18 mg von **21** (46  $\mu\text{mol}$ , 69 %) isoliert werden.

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.86 (s, 3H, H-1), 7.12 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.62 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.95 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 11.28 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.43 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 13.54 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.77 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 14.98 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ).  **$^{13}\text{C}$ -NMR** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 51.9, 98.1, 102.2, 138.6, 155.0, 155.8. **Schmp.**: ab 296 °C Zersetzung. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_9\text{O}_6$ : ber.: 390.0905; gef.: 390.0946; für  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_9\text{O}_6\text{Na}$ : ber.: 412.0725; gef.: 412.0725.



### 5.2.2 Synthese der neuen Liganden

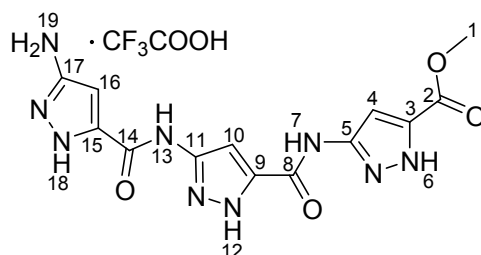
Synthese von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbon-säuremethylester **33**



273 mg des trimeren Pyrazolbausteins **29** (364  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden in 15 mL Tetrahydrofuran und 5 mL Methanol gelöst. Nach der Zugabe einer katalytischen Menge von Palladium auf Aktivkohle (10 mol%) wurde die Reaktion für 16 Stunden unter eine Wasserstoffatmosphäre gesetzt. Anschließend wurde der Katalysator über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingengt. Das ausgefallene Produkt wurde filtriert und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 215 mg der Verbindung **33** (299  $\mu\text{mol}$ , 82 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 3.70-3.72 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 3.85 (s, 3H, H-1), 4.85 (s, 2H, H-34), 5.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.36 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 6.83-6.90 (m, 6H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.11-7.22 (m, 7H, CH<sub>Aromat</sub>, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.65 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 10.90 (s, 1H, NH), 11.40 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 52.1, 52.2, 53.0, 53.2, 54.9, 55.0, 94.8, 101.0, 102.9, 113.5, 113.7, 113.8, 128.5, 128.7, 129.0, 129.6, 130.6, 131.1, 133.8, 134.0, 145.4, 154.1, 157.4, 158.3, 158.6, 158.7, 159.3. **Schmp.:** 182.3-183.1 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.07 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI):** für C<sub>37</sub>H<sub>37</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>H: ber.: 720.2889; gef.: 720.2901; für C<sub>37</sub>H<sub>37</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>Na: ber.: 742.2708; gef.: 742.2727.

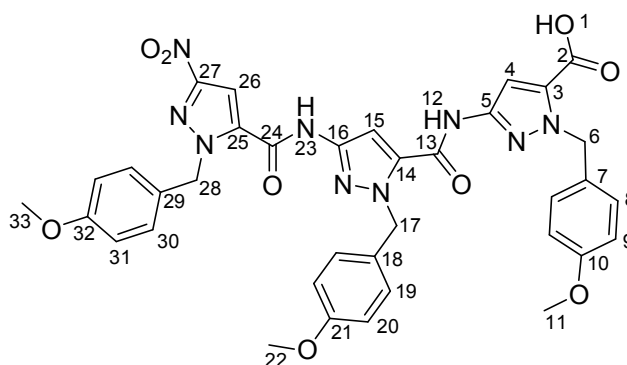
Synthese von 3-(3-(3-Amino-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat **35**



Unter Argon wurden 61 mg **33** (85  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in 3.50 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen. Im Anschluss wurde der beigefarbene Feststoff in Dichlormethan aufgenommen und das Lösungsmittel zügig unter vermindertem Druck entfernt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurde der Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet und es verblieben 24 mg der Substanz **35** (51  $\mu\text{mol}$ , 60 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.85 (s, 3H, H-1), 7.11 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.55 (brs, 2H), 11.20 (brs, 1H), 11.25 (brs, 1H), 12.18 (brs, 1H), 13.45 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.67 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.76 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 51.9, 98.4, 100.2, 114.5, 116.8, 132.8, 136.6, 145.0, 147.2, 153.9, 154.2, 156.2, 159.2. **Schmp.:** Zersetzung ab 272 °C. **HRMS (ESI):** für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_9\text{O}_4\text{H}$ : ber.: 360.1163; gef.: 360.1160; für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_9\text{O}_4\text{Na}$ : ber.: 382.0983; gef.: 382.0988.

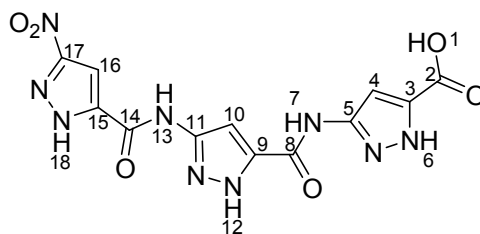
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **34**



In 20 mL Tetrahydrofuran und 10 mL Methanol wurden 1.00 g der Substanz **29** (1.33 mmol, 1.00 eq) gelöst. Danach wurden 81 mg Lithiumhydroxid (3.38 mmol, 2.54 eq) in 2 mL Wasser hinzugeben und die Reaktionslösung für 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der gelblich ölige Rückstand in Wasser aufgenommen. Unter starkem Rühren wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure auf pH = 1 angesäuert. Der ausfallende Niederschlag wurde filtriert, mit 1 M Salzsäure gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 0.92 g (1.25 mmol, 94 %) des farblosen Feststoffs **34** isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.70-3.71 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 5.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.86-6.91 (m, 6H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.14-7.20 (m, 5H, CH<sub>Aromat</sub>, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.25-7.30 (m, 2H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.71 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.99 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.39 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.53 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 55.0, 98.9, 103.0, 105.0, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 128.8, 129.3, 129.5, 134.2, 136.7, 143.6, 144.8, 145.4, 153.5, 155.4, 157.0, 158.7, 159.0, 160.3. **Schmp.**: 258.1-260.2 °C. **HRMS (ESI)**: für C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>: ber.: 734.2328; gef.: 734.2323.

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **36**

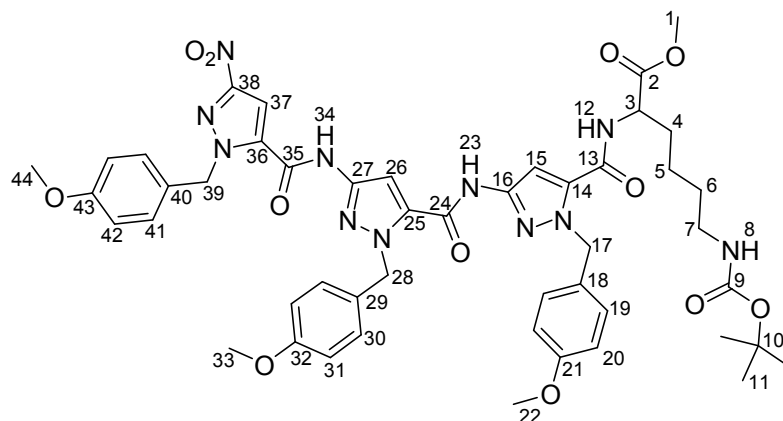


51 mg der Verbindung **34** (69  $\mu$ mol, 1.00 eq) wurden unter Argon in 3 mL Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden bei 70 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der ausfallende, farblose Feststoff filtriert, mit eiskaltem Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. In 93 %iger Ausbeute konnte Produkt **36** (23 mg, 64  $\mu$ mol) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.02 (brs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.56 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.94 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.17 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.42 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.51 (brs, 2H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 14.97 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 98.1, 98.3,

99.9, 102.2, 138.6, 155.0, 155.8, 156.6, 160.4. **Schmp.:** Zersetzung ab 313.4 °C. **HRMS (ESI):** für C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>9</sub>O<sub>6</sub>: ber.: 374.0592; gef.: 374.0611.

Synthese von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-6-(*tert*-butoxycarbonyl)-lysiny-carbonsäuremethylester **44**

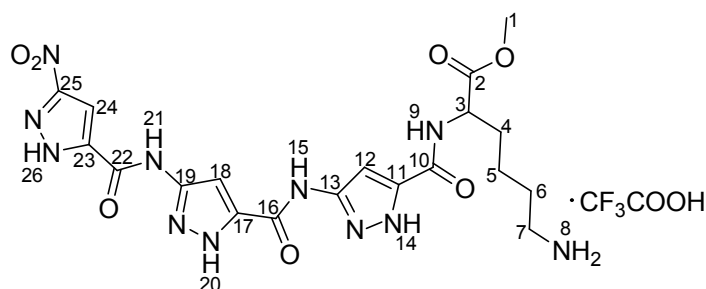


Unter Argon wurden 200 mg des trimeren Pyrazolbausteins **34** (0.27 mmol, 1.10 eq) in 25 mL absolutem Dichlormethan suspendiert. Nach tropfenweiser Zugabe von 0.19 mL DIEA (1.11 mmol, 4.50 eq) löste sich das Edukt vollständig. Anschließend wurden 95 mg Mukaiyama-Reagenz (0.37 mmol, 1.50 eq) und 73 mg *N*-Amino-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(*S*)-lysine-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (0.24 μmol, 1.00 eq) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Die gelbliche Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die Trocknung der vereinigten Phasen erfolgte über Magnesiumsulfat. Nachfolgende Entfernung des Lösungsmittels und säulenchromatographische Reinigung (*n*-Pentan/Ethylacetat 2:1) erbrachten eine Ausbeute von 63 % (153 mg, 0.16 μmol) des gewünschten Produkts **44**.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.37-1.54 (m, 13H, H-11, H-5, H-6), 1.71-1.83 (m, 1H, H-4), 1.88-1.99 (m, 1H, H-4), 3.05-3.14 (m, 2H, H-7), 3.75-3.76 (2s, 9H, H-22, H-33, H-44), 3.80 (s, 3H, H-1), 4.55 (brs, 1H, H-8), 4.67-4.75 (m, 1H, H-3), 5.54 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 4.3 Hz, CH<sub>2</sub>Benzy), 5.61 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, H-17), 5.75 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, H-17), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 6.80-6.85 (m, 7H, CH<sub>Aromat</sub>, H-12), 7.10 (s, 1H, CH<sub>Aromat</sub>, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.20-7.26 (m, 5H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.33 (brs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.37-7.41 (m, 2H, CH<sub>Aromat</sub>), 8.40 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 8.75 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 13.7, 14.2, 19.1, 21.0, 22.7,

28.4, 29.6, 30.6, 32.0, 40.1, 52.2, 52.8, 53.8, 54.1, 55.2, 56.0, 64.4, 98.2, 98.8, 103.6, 113.9, 114.1, 127.1, 130.1, 134.6, 135.0, 136.0, 144.7, 154.1, 156.1, 159.2, 159.3, 159.4, 159.8, 172.8. **Schmp.**: 94.4 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.10 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 2:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>H: ber.: 978.4104; gef.: 978.4144; C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>Na: ber.: 1000.3924; gef.: 1000.3942.

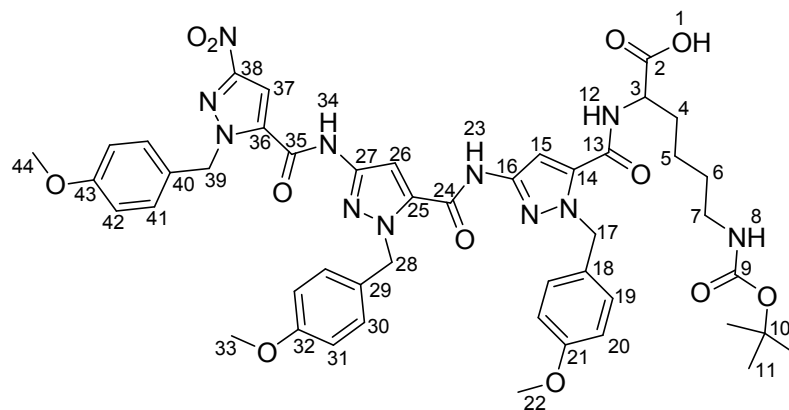
Synthese von 6-Amino-2-(-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-lysiny)-carbonsäuremethylester **45**



50 mg der Substanz **44** (51 µmol, 1.00 eq) wurden unter Argon in 2.80 mL Trifluoressigsäure gelöst und für sieben Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde diese tropfenweise mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der farblose Niederschlag wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es verblieben 37 mg des farblosen Feststoffs **45** (49 µmol, 96 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 1.38-1.42 (m, 2H, H-5), 1.53-1.59 (m, 2H, H-6), 1.81-1.84 (m, 2H, H-4), 2.78-2.82 (m, 2H, H-7), 3.67 (s, 3H, H-1), 4.42-4.45 (m, 1H, H-3), 7.41 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.61 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.65 (bs, 3H, H-8), 7.95 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.89 (d, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 11.16 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.42 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.28 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.45 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 14.97 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 22.3, 26.3, 29.6, 51.8, 97.5, 98.1, 102.0, 102.5, 154.8, 172.2. **Schmp.**: ab 198 °C Zersetzung. **HRMS (ESI)**: für C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>H: ber.: 518.1855; gef.: 518.1860.

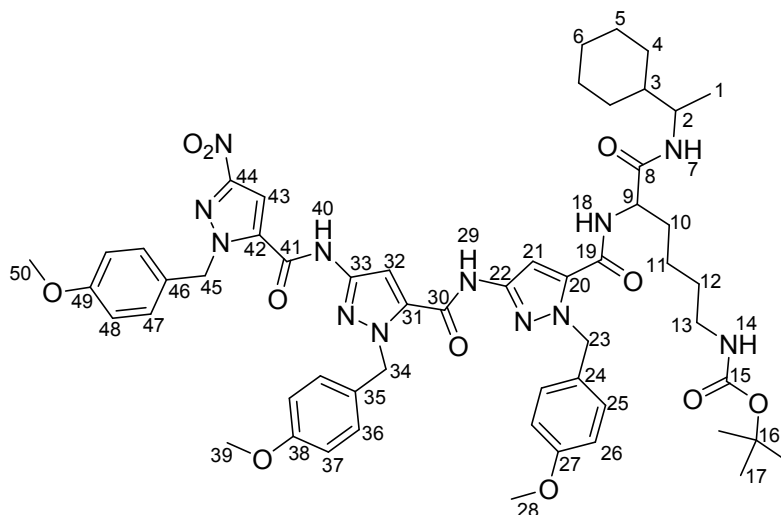
Synthese von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-6-(*tert*-butoxycarbonyl)-lysiny)-l-lysinsäure **51**



143 mg des Trimer-Lysins **44** (146  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden in 5 mL THF und 5 mL Methanol gelöst. Danach wurden 9 mg Lithiumhydroxid (376  $\mu\text{mol}$ , 2.57 eq) und 1 mL Wasser hinzugegeben und die Lösung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 1 M Salzsäure auf pH = 1 angesäuert. Der ausfallende Feststoff wurde filtriert, mit verdünnter Salzsäure nachgewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 111 mg (79 %, 115  $\mu\text{mol}$ ) des gewünschten Produkts **51** erhalten werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.21-1.41 (m, 13H, H-11, H-5, H-6), 1.67-1.86 (m, 2H, H-4), 2.87-2.91 (m, 2H, H-7), 3.70-3.71 (3s, 9H, H-21, H-32, H-43), 4.25 (brs, 1H, H-3), 5.59 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.68 (s, 2H, H-17), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.77 (t,  $^3J = 5.3$  Hz, 1H, H-8), 6.85-6.92 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.17-7.21 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.26-7.29 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.38 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.78 (d,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H, H-12), 11.34 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 28.1, 52.6, 54.9, 55.0, 77.2, 100.9, 105.0, 105.1, 105.3, 113.7, 113.8, 113.9, 127.9, 128.7, 129.0, 129.3, 129.5, 129.6, 134.3, 136.7, 144.8, 145.2, 153.5, 158.6, 159.0. **Schmp.**: 177.6-180.0 °C. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{Na}$ : ber.: 986.3767; gef.: 986.3760;  $\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ : ber.: 962.3802; gef.: 962.3839.

Synthese von 6-(1-Cyclohexylethylamino)-5-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxy-benzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-6-oxo-hexylcarbammat **52**



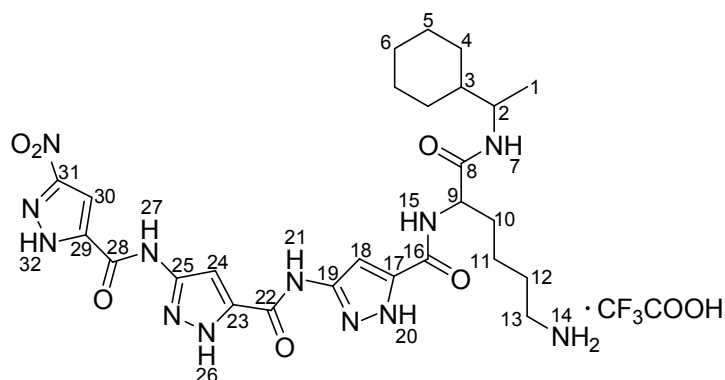
Unter Argon wurden 85 mg der Verbindung **51** (0.88 mmol, 1.10 eq) in einem Dichlormethan/DMF-Gemisch (3:1, 1.20 mL) gelöst. Nach Zugabe von 34 mg Cl-HOBt (0.20 mmol, 2.51 eq), 36.41 mg HCTU (0.88 mmol, 1.10 eq) und 28  $\mu$ L 2,6-Lutidin (1.20 mmol, 3.00 eq) wurde die Reaktionslösung für zehn Minuten unter Eiskühlung voraktiviert. Anschließend wurden 11.76  $\mu$ L Cyclohexylethylamin (0.80 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Extraktion der organischen Phase mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung wurde die Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Ethylacetat 3:1) und anschließende Trocknung im Ölpumpenvakuum erbrachte eine Ausbeute von 88 % der Substanz **52** (75.80 mg, 71  $\mu$ mol).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.87-0.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Cyclohexyl}$ ), 1.00-1.02 (d, 3H,  $^3J = 6.8$  Hz, H-1), 1.05-1.17 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Cyclohexyl}}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cyclohexyl}$ ), 1.24-1.39 (m, 14H, H-17, H-12, H-11, H-10), 1.52-1.69 (m, 7H,  $\text{CH}_2\text{Cyclohexyl}$ , H-10), 2.87-2.91 (m, 2H, H-13), 3.59-3.64 (m, 1H, H-2), 4.33-4.39 (m, 1H, H-9), 5.53-5.63 (m, 2H, H-23), 5.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.75 (t, 1H,  $^3J = 5.5$  Hz, H-14), 6.83-6.92 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.17-7.20 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.26-7.29 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.44 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.68 (d, 1H,  $^3J = 8.7$  Hz, H-7), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.58 (d, 1H,  $^3J = 8.1$  Hz, H-18), 11.33 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.5, 17.6,

18.5, 23.0, 25.6, 25.9, 28.2, 28.6, 28.7, 29.1, 30.1, 33.6, 42.3, 48.5, 55.0, 63.4, 77.2, 99.9, 100.8, 105.0, 113.6, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 129.0, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 134.7, 136.7, 144.8, 145.1, 153.5, 155.4, 155.5, 156.8, 158.6, 159.0, 170.5. **Schmp.:** 154.2-155.7 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.45 in Dichlormethan/Ethylacetat 3:1, 0.46 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI):** für C<sub>55</sub>H<sub>68</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>H: ber.: 1073.5203; gef.: 1073.5226; für C<sub>55</sub>H<sub>68</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>Na: ber.: 1095.5023; gef.: 1095.5008.

Synthese von *N*-(6-Amino-1-(1-cyclohexylethylamino)-1-oxohexan-2-yl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid-trifluoracetat

### 53



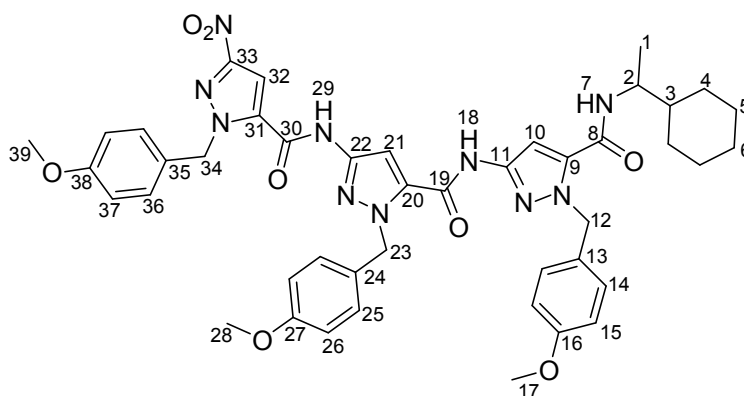
54 mg der Verbindung **52** (50 µmol, 1.00 eq) wurden in 3.50 mL Trifluoressigsäure gelöst und für 5 h auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende, hellgelbe Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen. Im Anschluss wurde der Feststoff in Dichlormethan aufgenommen und das organische Lösungsmittel rasch im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Es konnten 24 mg der Verbindung **53** (33 µmol, 66 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 0.85-1.02 (m, 5H, H-1 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz), CH<sub>2</sub>), 1.06-1.17 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 1.23-1.40 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 1.53-1.73 (m, 9H, CH<sub>2</sub>, CH), 2.73-2.81 (m, 2H, H-13), 3.58-3.65 (m, 1H, H-2), 4.38-4.45 (m, 1H, H-9), 7.38 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 7.59 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.66 (bs, 3H, H-14), 7.79 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 7.95 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.54 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.14 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.45 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.24 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.49 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 14.98 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 17.6, 17.7, 22.5, 25.6, 25.9, 26.6, 28.6, 28.7, 42.3, 48.5, 52.5, 98.1,



102.2, 138.6, 146.4, 155.0, 155.8, 157.7, 157.9, 170.5. **Schmp.:** Zersetzung ab 211 °C. **HRMS (ESI):** für  $C_{26}H_{36}N_{12}O_6H$ : ber.: 613.2954; gef.: 613.2971; für  $C_{26}H_{35}N_{12}O_6$ : ber.: 611.2808; gef.: 611.2804.

Synthese von *N*-(1-Cyclohexylethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **46**

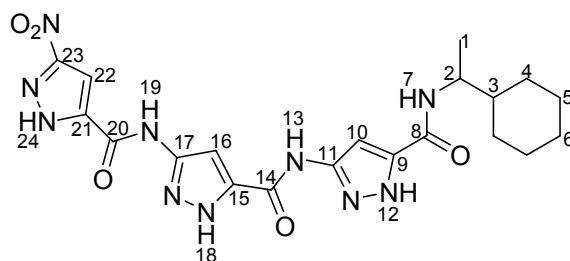


Zu einer Suspension aus 150 mg der trimeren Pyrazol-carbonsäure **34** (204  $\mu$ mol, 1.09 eq) in 12 mL absolutem Dichlormethan wurden langsam 0.10 mL Diisopropylethylamin (574  $\mu$ mol, 3.08 eq) zugetropft, wobei das Edukt vollständig in Lösung ging. Nach Zugabe von 57 mg 2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid (223  $\mu$ mol, 1.20 eq) und 27.70  $\mu$ L Cyclohexylethylamin (186  $\mu$ mol, 1.00 eq) wurde das Reaktionsgemisch für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die organische Phase jeweils dreimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt worden war, konnte das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/Ethylacetat 2:1) gereinigt werden. Als farbloser Feststoff konnte Verbindung **46** (131 mg, 155  $\mu$ mol) in 83 %iger Ausbeute isoliert werden.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.85-0.97 (m, 2H,  $CH_2$ Cyclohexyl), 1.09 (d,  $^3J$  = 6.8 Hz, 3H, H-1), 1.13-1.19 (m, 2H,  $CH_2$ Cyclohexyl), 1.34-1.41 (m, 1H, H-3), 1.59-1.74 (m, 4H,  $CH_2$ Cyclohexyl), 3.70-3.71 (3s, 9H, H-17, H-28, H-39), 3.76-3.84 (m, 1H, H-2), 5.55-5.63 (dd,  $^3J$  = 9.0 Hz,  $^3J$  = 14.5 Hz, 2H, H-12), 5.68 (s, 2H,  $CH_2$ Benzyl), 5.81 (s, 2H,  $CH_2$ Benzyl), 6.85-6.91 (m, 6H,  $CH$ Aromat), 7.15-7.19 (m, 4H,  $CH$ Aromat), 7.25-7.28 (m, 2H,  $CH$ Aromat), 7.31 (s, 1H,  $CH$ Pyrazol), 7.71 (s, 1H,  $CH$ Pyrazol), 7.98 (s, 1H,  $CH$ Pyrazol), 8.35 (d,  $^3J$  = 8.8 Hz, 1H, H-7), 11.33

(s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.50 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.5, 25.6, 25.9, 28.9, 29.1, 42.2, 48.8, 52.7, 53.0, 54.9, 55.0, 99.4, 100.9, 105.0, 113.6, 113.8, 114.0, 127.9, 128.6, 128.9, 129.3, 129.5, 129.8, 134.4, 135.4, 136.7, 144.8, 145.0, 153.5, 155.4, 156.8, 158.4, 158.6, 159.0. **Schmp.**: 178 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.42 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 2:1. **HRMS (ESI)**: für C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub>H: ber.: 845.3729; gef.: 845.3723; für C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub>Na: ber.: 867.3549; gef.: 867.3552.

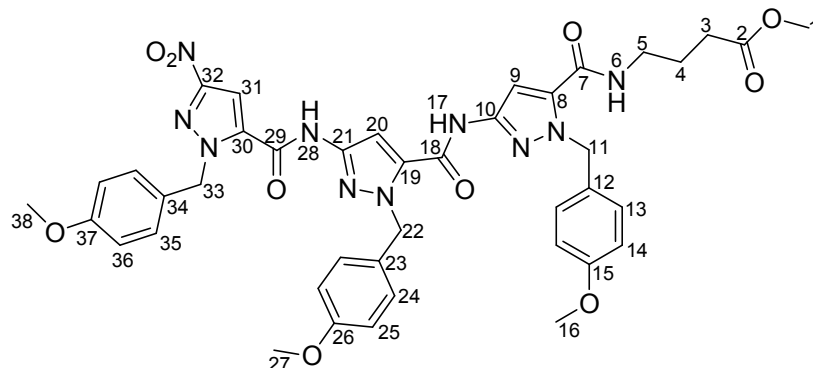
Synthese von *N*-(1-Cyclohexylethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **47**



Unter Schutzgas wurden 49 mg **46** (58  $\mu$ mol, 1.00 eq) in 3 mL absoluter Trifluoressigsäure für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und mit kaltem, trockenem Diethylether versetzt. Der ausfallende, beigefarbene Feststoff wurde filtriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 23 mg des Produkts **47** (47  $\mu$ mol, 82 %) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.90-1.22 (m, 8H, H-1, CH<sub>2</sub>Cyclohexyl), 1.37-1.42 (m, 1H, H-3), 1.59-1.75 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Cyclohexyl), 3.78-3.84 (m, 1H, H-2), 7.33 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.60 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.95 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.26 (bs, 1H, H-7), 11.12 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.43 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.15 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.46 (s, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 15.1, 17.6, 25.6, 25.9, 28.9, 29.1, 42.3, 48.7, 64.8, 96.8, 98.1, 102.2, 138.6, 155.0, 155.8, 156.4, 158.1. **Schmp.**: Zersetzung ab 265.6 °C. **HRMS (ESI)**: für C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>10</sub>O<sub>5</sub>H: ber.: 485.2004; gef.: 485.1966.

Synthese von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester **37**

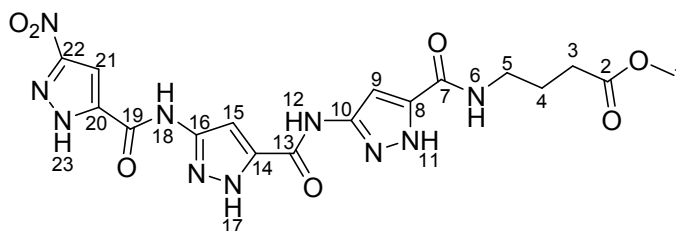


In 25 mL absolutem Dichlormethan wurden unter Argon 300 mg Trimer-Säure **34** (0.41 mmol, 1.00 eq) suspendiert. Nach tropfenweiser Zugabe von 0.32 mL Diisopropylethylamin (1.83 mmol, 4.50 eq) klarte die Lösung auf. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 156 mg 2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid (0.61 mmol, 1.50 eq) versetzt. Nachdem das Mukaiyama-Reagenz vollständig in Lösung gegangen war, wurden 62.60 mg  $\gamma$ -Amino-buttersäuremethylester-hydrochlorid (0.41  $\mu$ mol, 1.00 eq) hinzugegeben. Das Reaktions-gemisch wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die organische Phase jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/Ethylacetat 2:1) gereinigt. Nachfolgende Trocknung im Hochvakuum erbrachte **37** (193 mg, 231  $\mu$ mol, 57 %) in Form eines farblosen Feststoffs.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.74-1.79 (quin,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H, H-4), 2.34 (t,  $^3J$  = 7.4 Hz, 2H, H-3), 3.22-3.26 (q,  $^3J$  = 6.0 Hz,  $^3J$  = 6.6 Hz, 2H, H-5), 3.59 (s, 3H, H-1), 3.70-3.71 (3s, 9H, H-16, H-27, H-38), 5.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.86-6.91 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.16-7.19 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.25-7.28 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.31 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.66 (t,  $^3J$  = 5.5 Hz, 1H, H-6), 11.34 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.1, 30.6, 37.9, 51.2, 52.6, 53.1, 54.9, 55.0, 59.6, 99.4, 100.8, 105.0, 113.7, 113.8, 113.9, 127.9, 128.6, 128.9, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 134.9, 136.7, 144.8, 145.1, 153.5, 155.4, 156.8, 158.6, 159.0, 173.0. **Schmp.**: 198.8-201.7 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.08 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 2:1, 0.45 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**:

für  $C_{41}H_{42}N_{10}O_{10}H$ : ber.: 835.3158; gef.: 835.3187;  $C_{41}H_{42}N_{10}O_{10}Na$ : ber.: 857.2978; gef.: 857.3001;  $C_{41}H_{42}N_{10}O_{10}K$ : ber.: 873.2717; gef.: 873.2751;  $C_{41}H_{41}N_{10}O_{10}$ : ber.: 833.3013; gef.: 833.2999.

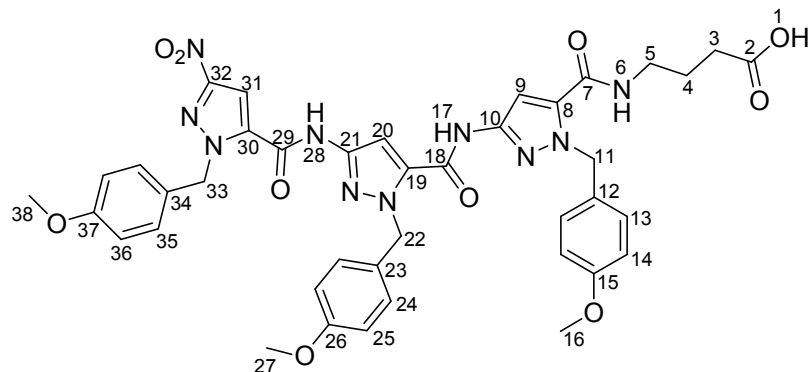
Synthese von 4-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester **38**



Unter Argon wurden 60 mg Trimer-GABA **37** (72  $\mu$ mol, 1.00 eq) in 3 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zu der Lösung tropfenweise kalter Diethylether hinzu gegeben. Der ausfallende, beigefarbene Niederschlag wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es verblieben 26 mg der Substanz **38** (55  $\mu$ mol, 76 %).

**$^1H$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.72-1.83 (quin,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H, H-4), 2.37 (t,  $^3J$  = 7.4 Hz, 2H, H-3), 3.23-3.29 (q,  $^3J$  = 6.0 Hz,  $^3J$  = 6.9 Hz, 2H, H-5), 3.59 (s, 3H, H-1), 7.16 (bs, 1H,  $CH_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.53 (bs, 1H,  $CH_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.94 (s, 1H,  $CH_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.53 (t,  $^3J$  = 5.4 Hz, 1H, H-6), 11.08 (bs, 1H,  $NH_{\text{Amid}}$ ), 11.44 (s, 1H,  $NH_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}C$ -NMR** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.3, 24.4, 30.6, 31.0, 37.8, 51.2, 87.4, 96.6, 102.2, 155.0, 155.8, 173.0, 174.1. **Schmp.**: Zersetzung ab 242 °C. **HRMS (ESI)**: für  $C_{17}H_{17}N_{10}O_7$ : ber.: 473.1287; gef.: 473.1317.

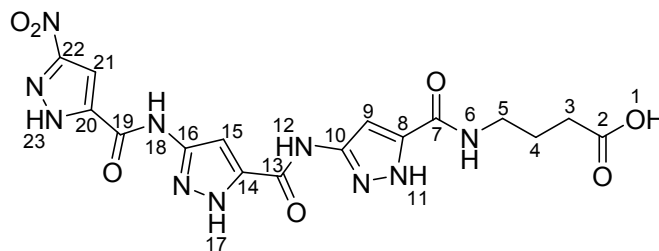
Synthese von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäure **39**



Zu einer Lösung aus 4 mL Tetrahydrofuran und 70 mg Trimer-GABA **37** (84  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden 4 mL Methanol und 10 mg Lithiumhydroxid (418  $\mu\text{mol}$ , 4.98 eq), gelöst in 2.50 mL Wasser, dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der gelbe, ölige Rückstand in Wasser aufgenommen. Mit 1 M Salzsäure wurde die Lösung auf pH = 1 angesäuert, der ausfallende Feststoff filtriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Als gelber Feststoff konnten 57 mg von **39** (69  $\mu\text{mol}$ , 83 %) isoliert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.71-1.77 (quin,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H, H-4), 2.34 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, H-3), 3.22-3.26 (q,  $^3J = 5.8$  Hz,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, H-5), 3.70-3.71 (3s, 9H, H-16, H-27, H-38), 5.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.86-6.91 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.16-7.20 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.25-7.28 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.32 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.66 (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, H-6), 11.33 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.2, 30.9, 38.1, 52.6, 53.1, 54.9, 55.0, 60.1, 72.2, 99.4, 100.8, 105.0, 113.7, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 128.9, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 135.0, 136.7, 144.8, 145.1, 153.5, 155.4, 156.8, 158.6, 159.0, 174.1. **Schmp.:** 209.3-211 °C. **HRMS (ESI):** für  $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{Na}$ : ber.: 843.2821; gef.: 843.2849.

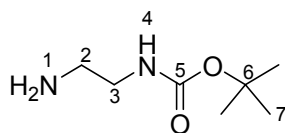
Synthese von 4-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäure **40**



Unter Schutzgasatmosphäre wurden 50 mg Trimer-GABA-Säure **39** (61  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in 3 mL trockener Trifluoressigsäure gelöst und auf 70 °C erwärmt. Nach fünf Stunden wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende, beigefarbene Feststoff wurde abzentrifugiert und viermal mit kaltem Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum konnten 22 mg der gewünschten Verbindung **40** (48  $\mu\text{mol}$ , 78 %) erhalten werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.72-1.78 (quin,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H, H-4), 2.28 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, H-3), 3.24-3.28 (q,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H, H-5), 7.20 (bs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.58 (bs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.94 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.53 (bs, 1H, H-6), 11.11 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.43 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 13.20 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.49 (brs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 14.98 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.4, 31.0, 37.9, 96.7, 98.1, 102.2, 138.6, 155.0, 155.8, 174.1. **Schmp.:** Zersetzung ab 231 °C. **HRMS (ESI):** für  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_{10}\text{O}_7$ : ber.: 459.1120; gef.: 459.1143.

Synthese von *tert*-Butyl-2-aminoethylcarbammat **41**

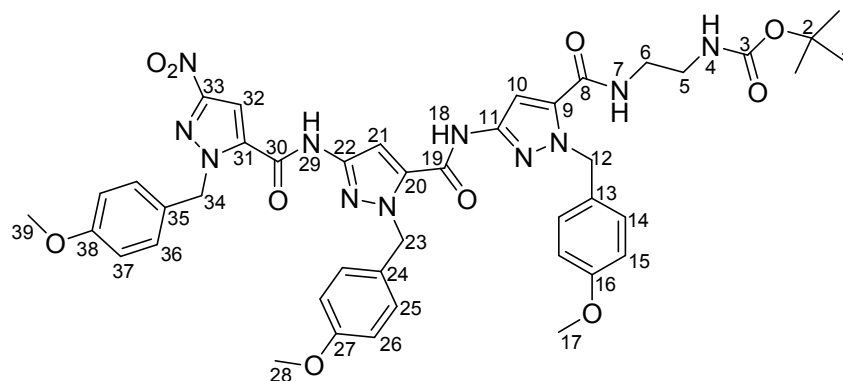


In 10 mL absolutem Chloroform wurden 5 g Ethylendiamin (83.19 mmol, 8.98 eq) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2.02 g Di-*tert*-butyldicarbonat (9.26 mmol, 1.00 eq), gelöst in 20 mL Chloroform, zugetropft. Das trübe Reaktionsgemisch wurde für 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat viermal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten,

organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Es konnten 1.22 g *tert*-Butyl-2-aminoethylcarbammat **41** (7.61 mmol, 82 %) als farbloser Feststoff hergestellt werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.42 (s, 9H, H-7), 2.18 (bs, 2H, H-1), 2.79 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H, H-3), 3.14-3.20 (m, 2H, H-2), 5.07 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 1H, H-4). Die Spektren stimmen mit der Literatur überein<sup>[220]</sup>

Synthese von *tert*-Butyl-2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)ethylcarbammat **42**

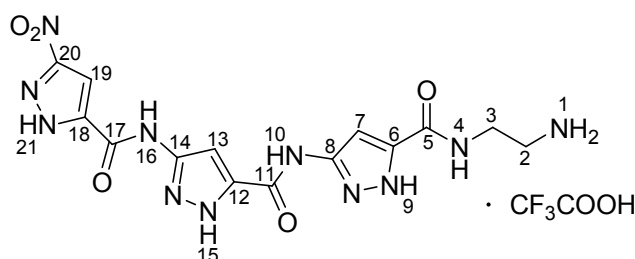


Unter Argon wurden 146 mg der Verbindung **34** (198  $\mu$ mol, 1.00 eq) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurden 80 mg HOBt (592.07  $\mu$ mol, 2.98 eq) hinzugefügt und die Lösung für zehn Minuten gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit 114 mg EDC-HCl (595  $\mu$ mol, 3.00 eq) versetzt und solange gerührt, bis sich die Substanz vollständig gelöst hatte. Dann wurden 64 mg *tert*-Butyl-2-aminoethylcarbammat **41** (399  $\mu$ mol, 2.01 eq) zur Lösung gegeben, die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 Stunden gerührt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Pentan/Essigsäureethylester 2:1) säulenchromatographisch gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum verblieben 142 mg der Substanz **42** (162  $\mu$ mol, 82 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.37 (s, 9H, H-1), 3.06-3.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23-3.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.70-3.71 (2s, 9H, H-17, H-28, H-39), 5.61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzy), 5.67 (s, 2H,

$\text{CH}_{2\text{Benzyl}}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_{2\text{Benzyl}}$ ), 6.86-6.91 (m, 7H, H-4,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.16-7.21 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.26-7.29 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.32 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.63 (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, H-7), 11.34 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.51 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 18.5, 20.6, 28.1, 30.1, 52.6, 53.1, 54.9, 55.0, 63.4, 77.6, 99.5, 100.9, 105.0, 113.7, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 129.0, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 134.9, 136.7, 144.8, 145.2, 153.5, 155.4, 155.6, 156.8, 158.6, 159.0, 159.1, 170.3, 171.9. **Schmp.**: 117.8 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.06 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 2:1, 0.54 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_{10}\text{H}$ : ber.: 878.3580; gef.: 878.3596;  $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_{10}\text{Na}$ : ber.: 900.3400, gef.: 900.3420.

Synthese von *N*-(2-Aminoethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **43**

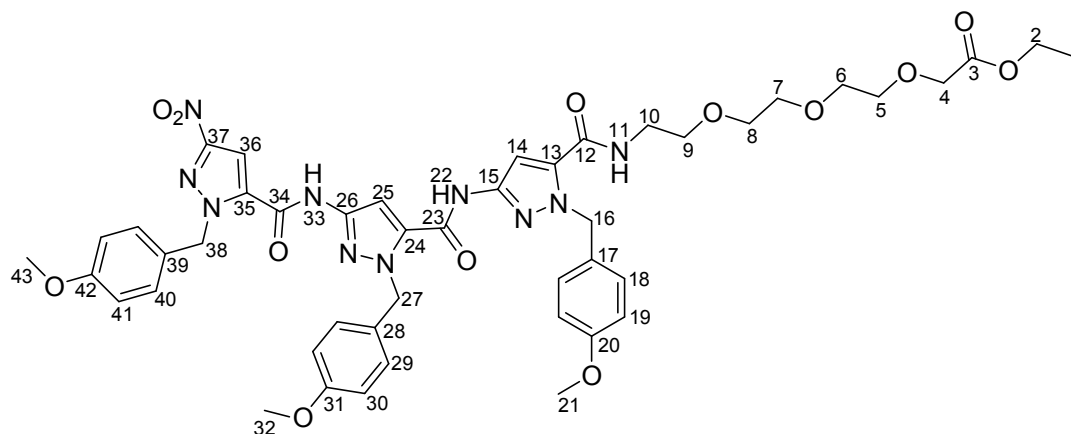


52 mg der Verbindung **42** (59  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden in 3 mL absoluter Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung langsam mit trockenem Diethylether versetzt. Der dabei ausfallende Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnte die gewünschte Verbindung **43** (16 mg, 30  $\mu\text{mol}$ ) in 51 %iger Ausbeute als Trifluoracetatsalz gewonnen werden.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.99 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.48 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.28 (bs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.61 (brs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.78 (bs, 1H, H-1), 7.95 (bs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.68 (bs, 1H, H-4), 11.18 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.42 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 13.31 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.47 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 36.5, 102.3, 136.4, 136.5, 138.6, 155.0, 156.3, 159.2. **Schmp.**: Zersetzung ab 256 °C. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_{11}\text{O}_5\text{Na}$ : ber.: 440.1150, gef.: 440.1188.



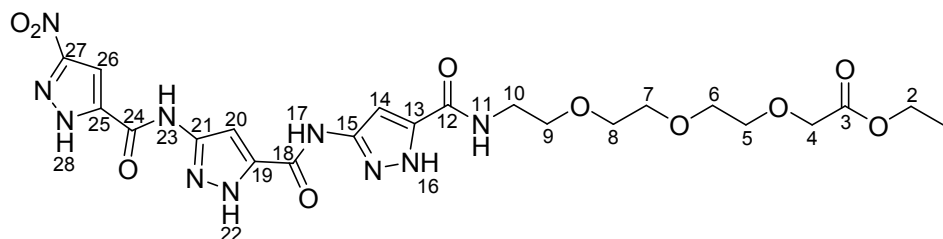
Synthese von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatriecan-13-säureethylester **54**



Unter Schutzgas wurden 200 mg Trimer-Säure **34** (272  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und die trübe Lösung auf 0 °C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 97 mg HOBt (828  $\mu\text{mol}$ , 3.05 eq), nach zehn Minuten mit 156 mg EDC  $\cdot$  HCl (816  $\mu\text{mol}$ , 3.00 eq) und nach weiteren zehn Minuten mit 128 mg des C-terminal geschützten Ethyl-2-{2-[2-(aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}acetat (544  $\mu\text{mol}$ , 2.00 eq) versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Lösung zwei Tage lang gerührt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan/Methanol 70:1). Es konnten 207 mg in Form eines farblosen Feststoffs **54** (218  $\mu\text{mol}$ , 80 %) isoliert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.24 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H, H-1), 3.58-3.74 (m, 12H, H-(5-10)), 3.76-3.77 (2s, 9H, H-21, H-32, H-43), 4.11 (s, 2H, H-4), 4.13-4.21 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H, H-2), 5.63 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.80 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.79-6.89 (m, 7H, H-11,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.11 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.24-7.30 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.37-7.41 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 8.40 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 8.43 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.1, 39.5, 53.7, 53.9, 55.2, 55.9, 60.9, 68.6, 69.5, 70.3, 70.4, 70.5, 70.8, 98.1, 98.9, 103.7, 113.9, 114.1, 127.1, 128.7, 129.2, 130.0, 134.7, 135.7, 136.1, 144.7, 154.1, 155.1, 156.2, 159.2, 159.3, 159.5, 159.7, 170.5. **Schmp.**: 78.6 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.18 in Dichlormethan/Methanol 70:1. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{H}$ : ber.: 953.3788; gef.: 953.3766;  $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_{10}\text{Na}$ : ber.: 975.3608, gef.: 975.3591.

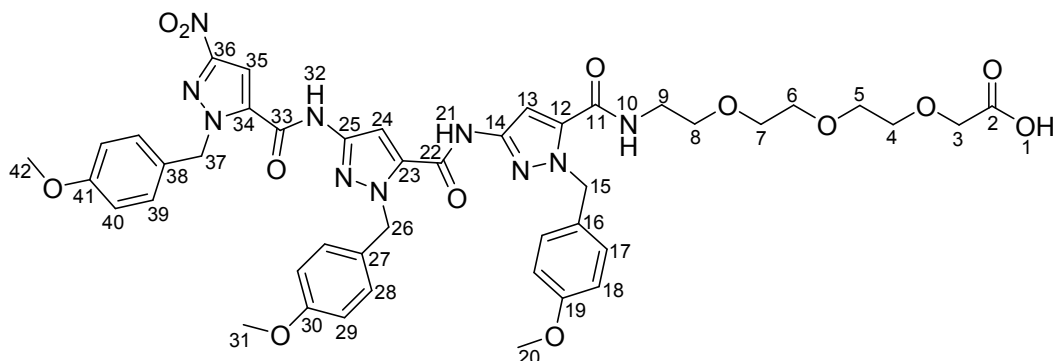
Synthese von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säureethylester **55**



49 mg Trimer-Triethylenglykol **54** (52  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) wurden unter Argon in 3 mL trockener Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende Niederschlag wurde abzentrifugiert und viermal mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde in Dichlormethan aufgenommen und das Lösungsmittel wurde zügig unter vermindertem Druck entfernt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum verblieben 30 mg des gewünschten Produkts **55** (51  $\mu\text{mol}$ , 98 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.18 (t,  $^3J$  = 7.1 Hz, 3H, H-1), 3.38-3.42 (m, 2H, H-10), 3.53-3.59 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 4.08-4.12 (m, , 4H, H-2, H-4), 7.27 (bs, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.59 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.95 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.40 (s, 1H, H-11), 11.12 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.43 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 13.22 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 13.48 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 14.98 (bs, 1H,  $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$ ).  
 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.0, 60.0, 67.6, 68.7, 69.5, 69.6, 69.9, 98.2, 102.2, 138.6, 146.4, 146.5, 155.0, 155.8, 156.3, 170.0. **Schmp.:** Zersetzung ab 264.3 °C.  
**HRMS (ESI):** für  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{H}$ : ber.: 593.2063; gef.: 593.2071;  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{Na}$ : ber.: 615.1882; gef.: 615.1899.

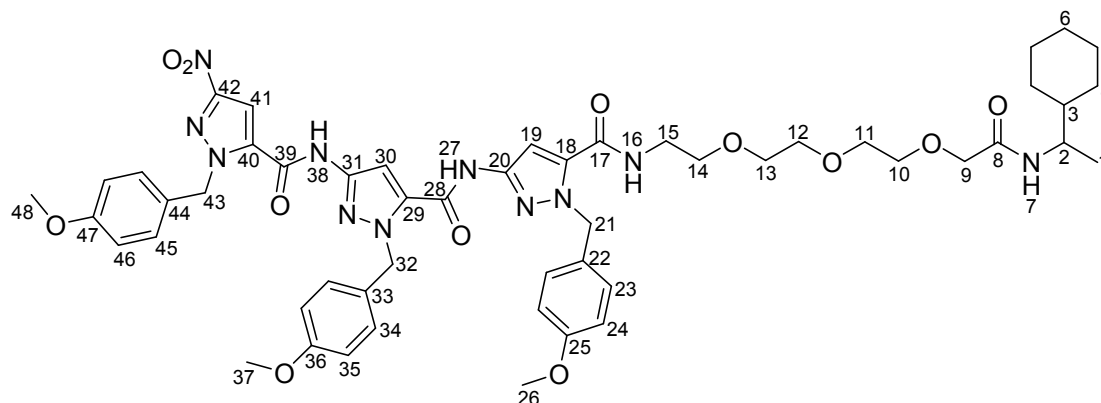
Synthese von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridec-13-säure **56**



Zu 5 mL Tetrahydrofuran und 5 mL Methanol wurden 153 mg Trimer-Triethylenglykol **54** (161  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq), 14 mg Lithiumhydroxid (585  $\mu\text{mol}$ , 3.64 eq) und 1 mL Wasser hinzugegeben. Die Lösung wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 1 M Salzsäure versetzt. Der farblos ausfallende Feststoff wurde filtriert und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 137 mg der Verbindung **56** (148  $\mu\text{mol}$ , 92 %) erhalten werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.36-3.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.51-3.58 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 3.70-3.71 (2s, 9H, H-20, H-31, H-42), 4.00 (s, 2H, H-3), 5.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.86-6.91 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.16-7.19 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.26-7.28 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.33 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.98 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.71 (t,  $^3J = 5.5$  Hz, 1H, H-10), 11.33 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 12.55 (bs, 1H, H-1).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 52.7, 53.1, 55.0, 67.5, 68.5, 69.4, 69.6, 69.7, 99.5, 100.8, 105.0, 113.7, 113.8, 113.9, 127.9, 128.7, 128.9, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 134.8, 136.7, 144.8, 145.1, 153.5, 155.4, 156.8, 158.5, 158.6, 159.0, 159.1, 171.5. **Schmp.**: 88 °C. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{H}$ : ber.: 925.3475; gef.: 925.3445;  $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{Na}$ : ber.: 947.3295; gef.: 947.3251.

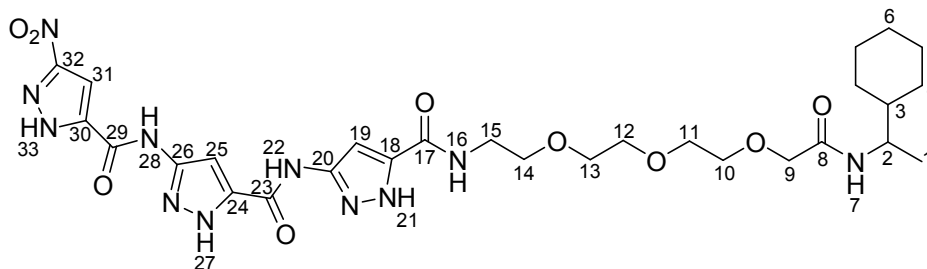
Synthese von *N*-(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **57**



Unter Argon wurden 110 mg Trimer-Triethylenglykol-Säure **56** (119  $\mu\text{mol}$ , 1.09 eq) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und mit 56.50  $\mu\text{L}$  Diisopropylethylamin (324  $\mu\text{mol}$ , 2.98 eq) versetzt. Nach der Zugabe von 41 mg des Mukaiyama-Reagenz (161  $\mu\text{mol}$ , 1.47 eq) wurden zu der klaren gelben Lösung 16  $\mu\text{L}$  Cyclohexylethylamin (109  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) dazugetropft. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die organische Phase jeweils dreimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde an einer mit Kieselgel befüllten Säule gereinigt (Dichlormethan/Methanol 70:1). Es konnten 84 mg eines farblosen Feststoffs **57** (81  $\mu\text{mol}$ , 75 %) isoliert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.81-0.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.00 (d,  $^3J = 6.7$  Hz, 3H, H-1), 1.04-1.07 (m, 3H,  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1.23-1.28 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 1.55-1.66 (m, 5H,  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.55-3.71 (m, 21H, H-(10-15), H-2, H-26, H-37, H-48), 4.85 (s, 2H, H-9), 5.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.66 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 5.81 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Benzyl}$ ), 6.86-6.91 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.16-7.19 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.24-7.33 (m, 4H, H-7,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ,  $\text{CH}_{\text{Aromat}}$ ), 7.70 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 7.97 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$ ), 8.70 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H, H-16), 11.33 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 11.50 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.6, 25.6, 25.9, 28.8, 38.6, 42.2, 48.1, 52.7, 53.1, 55.0, 55.1, 68.6, 69.5, 69.7, 70.2, 99.6, 100.9, 105.0, 113.7, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 128.9, 129.3, 129.5, 129.7, 134.3, 134.9, 136.7, 144.8, 145.2, 153.5, 155.4, 158.6, 159.0, 159.1, 168.3. **Schmp.**: 189.9-191.2 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.35 in Dichlormethan/Methanol 70:1. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{H}$ : ber.: 1034.4730; gef.: 1034.4757;  $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{Na}$ : ber.: 1056.4550; gef.: 1056.4588.

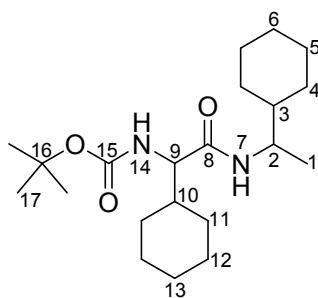
Synthese von *N*-(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **58**



In 2.50 mL absoluter Trifluoressigsäure wurden 42 mg Trimer-TEG-Che **57** (41  $\mu$ mol, 1.00 eq) gelöst und für fünf Stunden bei 70 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit eiskaltem Diethylether versetzt und der ausfallende beigefarbene Niederschlag abzentrifugiert. Der Feststoff wurde fünfmal mit Diethylether gewaschen und in Dichlormethan aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde zügig unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang viermal wiederholt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum verblieben 20 mg von **58** (30  $\mu$ mol, 72 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.83-1.33 (m, 9H, H-1, CH<sub>2</sub>Cyclohexyl), 1.56-1.67 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Cyclohexyl, CH<sub>2</sub>Cyclohexyl), 3.39-3.39 (m, 13H, H-2, H-(10-15)), 3.86 (s, 2H, H-9), 7.26-7.29 (bs, 2H, CH<sub>Pyrazol</sub>, NH<sub>Amid</sub>), 7.59 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.95 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.64 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.14 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.44 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.22 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.48 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.6, 25.6, 25.9, 28.7, 28.8, 38.4, 42.1, 48.1, 51.0, 59.9, 60.1, 68.7, 69.5, 69.7, 70.2, 80.5, 102.2, 138.6, 155.0, 155.8, 168.2. **Schmp.**: Zersetzung ab 153 °C. **HRMS (ESI)**: für C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Na: ber.: 696.2824; gef.: 696.2808; C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Na: ber.: 672.2859; gef.: 672.2874.

Synthese von *tert*-Butyl-1-cyclohexyl-2-(1-cyclohexylethylamino)-2-oxoethylcarbammat **75**



## Variante A:

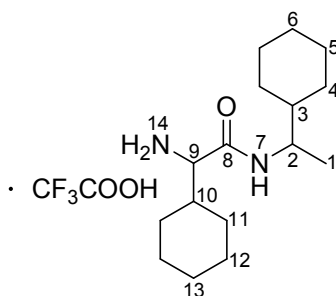
Unter Eiskühlung wurden 200 mg Boc-Cyclohexylglycin (0.78 mmol, 1.00 eq) in 1.50 mL absolutem Dichlormethan und 0.50 mL absolutem *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt. Nach Zugabe von 329 mg Cl-HOBt (1.94 mmol, 2.51 eq), 386 mg HCTU (0.93 mmol, 1.20 eq) und 0.27 mL 2,6-Lutidin (2.32 mmol, 2.98 eq) wurde das Reaktionsgemisch für zehn Minuten voraktiviert. Tropfenweise wurden 115  $\mu$ L Cyclohexylethylamin (0.78 mmol, 1.00 eq) hinzugefügt und die Lösung für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Nach Trocknung im Hochvakuum konnten 198 mg der Verbindung **75** (540  $\mu$ mol, 70 %) als farbloser Feststoff isoliert werden.

## Variante B:

Unter Schutzgasatmosphäre wurden 200 mg Boc-Cyclohexylglycin (0.78 mmol, 1.00 eq) in 10 mL absolutem Dichlormethan suspendiert und mit 0.41 mL Diisopropylethylamin (2.35 mmol, 3.03 eq) und 298 mg 2-Chloro-1-methyl-pyridiniumiodid (1.17 mmol, 1.50 eq) versetzt. Nach dem Aufklaren des Reaktionsgemisches wurden 115  $\mu$ L Cyclohexylethylamin (0.78  $\mu$ mol, 1.00 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der entstandene Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet. In 52 %iger Ausbeute konnte *tert*-Butyl-1-cyclohexyl-2-(1-cyclohexylethylamino)-2-oxoethylcarbammat **75** (148 mg, 0.40  $\mu$ mol) erhalten werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.85-1.18 (m, 13H, H-1,  $\text{CH}_2$ ), 1.23-1.29 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 1.32-1.44 (m, 9H, H-17), 1.47-1.75 (m, 11H,  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.55-3.63 (m, 1H, H-2), 3.73-3.81 (t,  $^3J$  = 7.6 Hz, 1H, H-9), 6.45 (d,  $^3J$  = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.52 (d,  $^3J$  = 8.6 Hz, 1H, H-14).

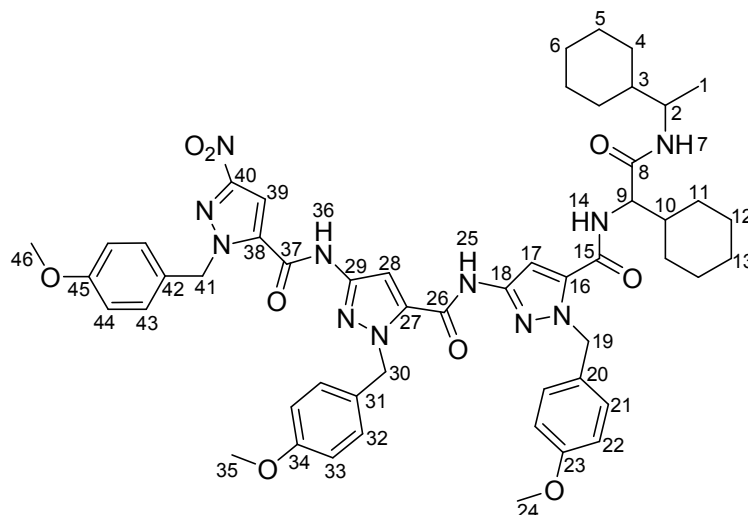
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.4, 25.5, 25.7, 26.0, 28.0, 28.1, 28.5, 28.6, 29.2, 42.1, 48.4, 59.1, 77.8, 155.2, 170.2. **Schmp.:** 99.6-102.4 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.91 *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI):** für  $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3\text{H}$ : ber.: 367.2955; gef.: 367.3001;  $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ : ber.: 389.2797, gef.: 389.2831.

Synthese von 2-Amino-2-cyclohexyl-*N*-(1-cyclohexylethyl)acetamid-trifluoracetat **48**

210 mg *tert*-Butyl-1-cyclohexyl-2-(1-cyclohexylethylamino)-2-oxoethylcarbamate **75** (573  $\mu$ mol, 1.00 eq) wurden in 10 mL absolutem Dichlormethan und 2 mL Trifluoressigsäure gelöst und bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur mehrere Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit etwa 20 mL Benzol versetzt und das Lösungsmittelgemisch zügig unter vermindertem Druck entfernt. Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt. Durch nachfolgende Trocknung im Hochvakuum konnten 188 mg der Verbindung **48** (494  $\mu$ mol, 86 %) als farbloser Feststoff erzielt werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.88-0.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.03 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H, H-1), 1.06-1.20 (m, 7H,  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1.27-1.35 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 1.58-1.76 (m, 12H, H-), 3.51 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, H-9), 3.64-3.73 (m, 1H, H-2), 8.03 (br s, 3H, H-14), 8.17 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, H-7).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.1, 25.3, 25.4, 25.6, 25.9, 27.5, 28.2, 28.5, 42.1, 49.0, 56.9, 166.7. **Schmp.**: Zersetzung ab 185.3 °C. **HRMS (ESI)**: für  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{OH}$ : ber.: 267.2431; gef.: 267.2442;  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{ONa}$ : ber.: 289.2250, gef.: 289.2262.

Synthese von *N*-(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexylethylamino)-2-oxoethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **49**



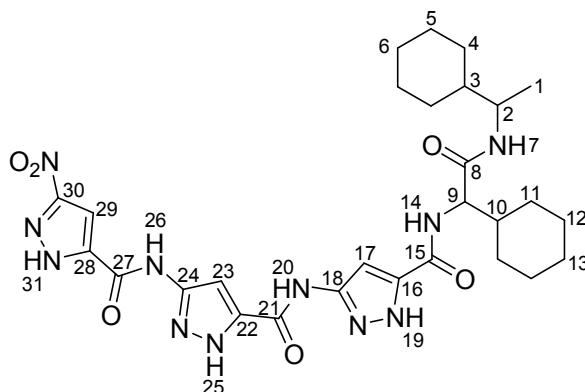
Unter Argon wurden 200 mg Trimer-Säure **34** (0.27 mmol, 1.00 eq) in 20 mL absolutem Dichlormethan suspendiert. Nach dem Zutropfen von 0.21 mL Diisopropylethylamin (1.21 mmol, 4.45 eq) klarte die Lösung auf und es wurden 104 mg Mukaiyama-Reagenz (0.41 mmol, 1.50 eq) hinzugefügt. Anschließend wurden zu der Reaktionslösung 103 mg 2-Amino-2-cyclohexyl-*N*-(1-cyclohexylethyl)acetamid-trifluoracetat **48** (0.27 mmol, 1.00 eq), gelöst in 5 mL absolutem Dichlormethan, gegeben. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die organische Phase jeweils zweimal mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethylacetat 7:1) gereinigt. In einer Ausbeute von 48 % konnte Verbindung **49** (128 mg, 0.13 mmol) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ [ppm] = 0.89-1.18 (m, 13H, H-1, CH<sub>2</sub>), 1.26-1.32 (m, 1H, CH), 1.56-1.80 (m, 11H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.59-3.63 (m, 1H, H-2), 3.70-3.71 (2s, 9H, H-24, H-35, H-46), 4.28 (t, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 5.53-5.60 (dd, <sup>3</sup>J = 14.5 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H, H-19), 5.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.82-6.80 (m, 6H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.16-7.18 (m, 4H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.26-7.28 (m, 2H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.40 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.71 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.79 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.97 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.46 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, H-14), 11.32 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.50 (s, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ [ppm] = 17.3, 25.6, 25.7, 28.5, 28.6, 28.7, 42.0, 55.0, 68.2, 100.8, 113.6, 113.8, 114.0, 127.9, 128.7, 128.9, 129.3,



129.5, 129.6, 134.8, 136.7, 156.8, 158.6, 158.9, 159.0, 169.2, 169.5. **Schmp.:** 216 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.40 in Dichlormethan/Ethylacetat 7:1. **HRMS (ESI):** für C<sub>52</sub>H<sub>61</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>H: ber.: 984.4726; gef.: 984.4737; C<sub>52</sub>H<sub>61</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Na: ber.: 1006.4546, gef.: 1006.4492.

Synthese von *N*-(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexyletylamino)-2-oxoethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **50**



30 mg **49** (30 µmol, 1.00 eq) wurden unter Schutzgasatmosphäre in 2.00 mL Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit kaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende Feststoff wurde abzentrifugiert und mehrmals mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff in Dichlormethan aufgenommen und das organische Lösungsmittel rasch im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt und nachfolgende Trocknung im Ölpumpenvakuum erbrachte eine Ausbeute von 89 % von **50** (17 mg, 27 µmol).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 0.89-1.21 (m, 13H, H-1, CH<sub>2</sub>), 1.27-1.33 (m, 1H, CH), 1.59-1.79 (m, 11H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.60-3.66 (m, 1H, H-2), 4.33 (bs, 1H, H-9), 7.39 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.60 (bs, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.86 (bs, 1H, H-7), 7.96 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 8.35 (bs, 1H, H-14), 11.11 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.42 (bs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 13.23 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>), 13.47 (bs, 1H, NH<sub>Pyrazol</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 17.2, 25.3, 25.4, 25.6, 25.9, 28.4, 28.5, 28.7, 29.1, 30.3, 42.0, 48.6, 57.6, 98.0, 98.2, 102.2, 136.4, 136.5, 138.6, 146.5, 146.4, 146.6, 155.0, 155.2, 155.8, 169.6. **Schmp.:** Zersetzung ab 248.6 °C. **HRMS (ESI):** für C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>11</sub>O<sub>6</sub>: ber.: 622.2856; gef.: 622.2878.

### 5.2.3 Lösungssynthese des Pentapeptids KLVFF

#### 5.2.3.1 Allgemeine Kupplungsvorschrift der Boc-geschützten Aminosäuren

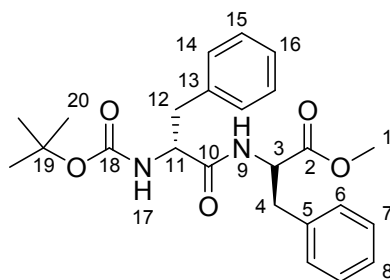
Unter Schutzgasatmosphäre wurde 1.00 eq der *N*-terminal und gegebenenfalls Seitengruppen geschützten Aminosäure (bzw. des Peptids) in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem Dichlormethan/DMF (3:1) möglichst konzentriert vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 2.50 eq Cl-HOBt, 1.00 eq HCTU und 4.00 eq 2,6-Lutidin versetzt und für zehn Minuten unter Eiskühlung voraktiviert. Danach wurde 1.00 eq der *C*-terminal geschützten Aminosäure, gelöst in wenig des gleichen Lösungsmittelgemisches, zu der Reaktionslösung gegeben. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die organische Phase wurde mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum eingengt und das Produkt über Nacht auskristallisiert. Der entstandene Feststoff wurde filtriert und im Hochvakuum getrocknet.

#### 5.2.3.2 Allgemeine Vorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe

Das Boc-geschützte Peptid (1.00 eq) wurde unter Argon in einem Gemisch, bestehend aus Dichlormethan/Trifluoressigsäure (5:1), unter Eiskühlung vorgelegt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde Dichlormethan im Membranpumpenvakuum entfernt und die verbleibende Trifluoressigsäure mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende farblose Feststoff wurde filtriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

### Darstellung von *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalanin-methylester

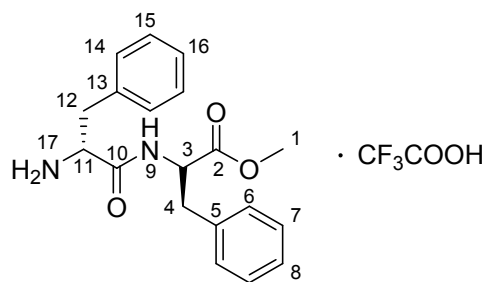
76



Unter Argon wurden 2.50 g *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*S*)-phenylalanin (9.43 mmol, 1.00 eq) und 2.03 g (*S*)-Phenylalaninmethylester Hydrochlorid (9.43 mmol, 1.00 eq) mit 3.90 g HCTU (9.43 mmol, 1.00 eq), 3.99 g Cl-HOBt (23.58 mmol, 2.50 eq) und 4.39 mL 2,6-Lutidin (37.72 mmol, 4.00 eq) gemäß der allgemeinen HCTU-Kupplungsvorschrift (s. 5.3.1) in insgesamt 18 mL des Lösungsmittelgemischs umgesetzt. Es konnten 2.48 g des farblosen Feststoffs **76** (5.82 mmol, 62 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.40 (s, 9H, H-20), 3.00-3.06 (m, 4H, H-4,12), 3.67 (s, 3H, H-1), 4.27-4.35 (m, 1H, H-3), 4.77-4.79 (m, 1H, H-11), 4.91 (brs, 1H, H-9), 6.23 (d,  $^3J$  = 7.0 Hz, 1H, H-17), 6.96-6.99 (m, 5H, H-(6-8)), 7.18-7.24 (m, 5H, H-(14-16)). **Schmp.**: 132 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.80 in Dichlormethan/Methanol 30:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

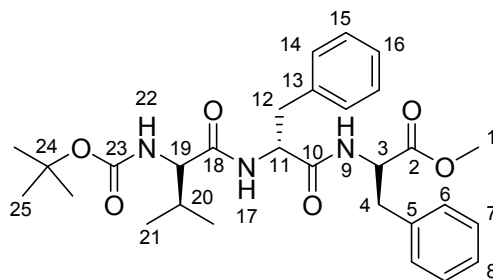
#### Darstellung von (*S*)-Phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester-trifluoracetat **77**



Das Boc-geschützte Peptid **76** (4.12 g, 9.67 mmol) wurde unter Argon in Dichlormethan/Trifluoressigsäure (35 mL) nach der Vorschrift unter Absatz 5.3.2 bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Es konnten 3.76 g (8.55 mmol, 88 %) der gewünschten Verbindung **77** synthetisiert werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.87-3.12 (m, 4H, H-(4,12)), 3.60 (s, 3H, H-1), 4.02 (brs, 1H, H-11), 4.53-4.61 (m, 1H, H-3), 7.20-7.35 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)), 8.09 (brs, 3H, H-17), 8.96 (d,  $^3J$ =7.62 Hz, 1H, H-9). **Schmp.**: 135 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.14 in Dichlormethan/Methanol 30:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

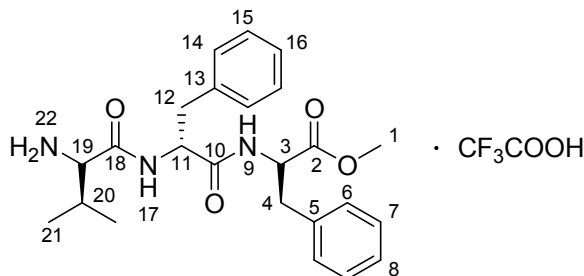
Darstellung von *N*-*tert*.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **78**



1.86 g *N*-*tert*.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-valin (8.55 mmol, 1.00 mmol) und 3.76 g der Verbindung **77** (8.55 mmol, 1.00 eq) mit 3.54 g Cl-HOBt (8.55 mmol, 1.00 eq), 3.62 g HCTU (21.38 mmol, 2.50 eq) und 3.98 mL 2,6-Lutidin (34.20 mmol, 4.00 eq) wurden nach der HCTU-Kupplungsvorschrift in insgesamt 21 mL Dichlormethan und 7 mL DMF umgesetzt. Es konnten 2.62 g von *N*-*tert*.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **78** (4.98 mmol, 58%) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 0.78 (d,  $^3J=6.78$  Hz, 3H, H-21<sub>a</sub>), 0.87 (d,  $^3J=6.78$  Hz, 3H, H-21<sub>b</sub>), 1.44 (s, 9H, H-25), 2.02-2.13 (m, 1H, H-20), 2.93-3.14 (m, 4H, H-(4,12)), 3.66 (s, 3H, H-1), 3.89 (dd,  $^3J=5.79$  Hz,  $^3J=5.67$  Hz, 1H, H-19), 4.59-4.66 (m, 1H, H-3), 4.69-4.76 (m, 1H, H-11), 4.90 (d,  $^3J=7.17$  Hz, 1H, H-22), 6.16 (d,  $^3J=7.26$  Hz, 1H, H-17), 6.47 (d,  $^3J=7.20$  Hz, 1H, H-9), 6.93-7.31 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)). **Schmp.**: 131 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.79 in Dichlormethan/Methanol 30:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Darstellung von (*S*)-Valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester Trifluoracetat **79**

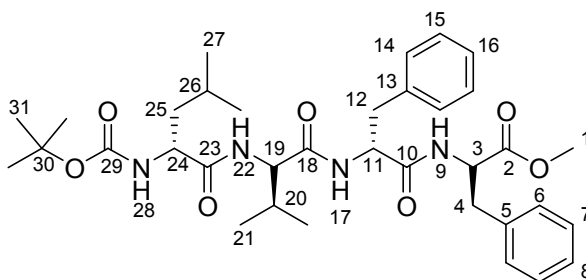


In einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 20 mL Dichlormethan und 4 mL Trifluoressigsäure, wurden 2.62 g der Verbindung **78** (4.99 mmol, 1.00 eq) bis zum vollständigen Umsatz gerührt. In 88%iger Ausbeute konnte (*S*)-Valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-

(*S*)-phenylalaninmethylester **79** (2.38 g, 4.41 mmol) in Form farbloser Kristalle isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.82 (d,  $^3J=6.90$  Hz, 3H, H-21 $_{\alpha}$ ), 0.87 (d,  $^3J=6.93$  Hz, 3H, H-21 $_{\beta}$ ), 2.00-2.06 (m, 1H, H-20), 2.68-3.07 (m, 4H, H-(4,12)), 3.56 (brs, 4H, H-(1,19)), 4.46-4.53, 4.58-4.65 (2m, 2H, H-(3,11)), 7.17-7.27 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)), 7.96 (brs, 3H, H-22), 8.53 (d,  $^3J=8.25$  Hz, 1H, H-17), 8.64 (d,  $^3J=7.92$  Hz, 1H, H-9). **Schmp.:** 155 °C. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

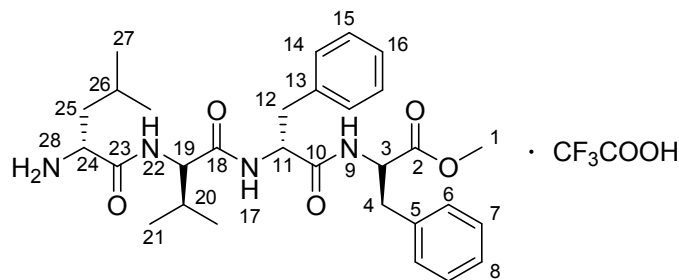
Darstellung von *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **80**



Unter Schutzgasatmosphäre wurden 1.38 g *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-leucin (6.84 mmol, 1.55 eq), 2.92 g HCTU (7.06 mmol, 1.60 eq), 2.94 g Cl-HOBt (17.33 mmol, 3.93 eq) und 2.41 mL 2,6-Lutidin (20.73 mmol, 4.70 eq) in absolutem Dichlormethan/DMF (40 mL) vorgelegt und mit einer Lösung aus 2.38 g der Verbindung **79** (4.41 mmol, 1.00 eq) und 0.52 mL 2,6-Lutidin (4.41 mmol, 1.00 eq) in Dichlormethan/DMF (12 mL) versetzt. Die Aufarbeitung wurde nach der Vorschrift unter Absatz 5.3.1 durchgeführt. *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **80** (2.52 g, 3.95 mmol) konnte in 90 %iger Ausbeute synthetisiert werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.69-0.85 (m, 12H, H-27, H-21), 1.28 (brs, 2H, H-20, H-26), 1.35 (s, 9H, H-31), 1.50-1.58 (m, 1H, H-25 $_{\alpha}$ ), 1.82-1.89 (m, 1H, H-25 $_{\beta}$ ), 2.88-3.04 (m, 4H, H-(4,12)), 3.54 (s, 3H, H-1), 3.91-4.56 (m, 4H, H-(3,11,19,24)), 7.04 (d,  $^3J=8.46$  Hz, 1H, NH), 7.14-7.28 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)), 7.42 (d,  $^3J=9.12$  Hz, 1H, NH), 8.06 (d,  $^3J=8.19$  Hz, 1H, NH), 8.41 (d,  $^3J=7.41$  Hz, 1H, NH). **Schmp.:** 181.5 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.16 in Dichlormethan/Methanol 30:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

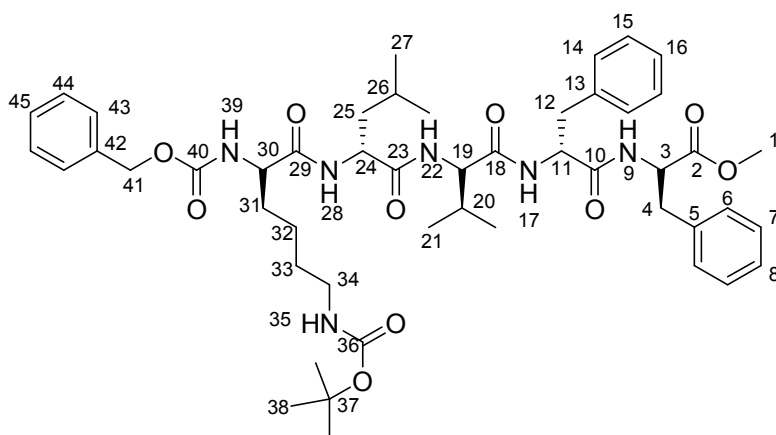
Darstellung von (S)-Leucinyl-(S)-valinyl-(S)-phenylalaninyl-(S)-phenylalanin-methylester  
Trifluoracetat **81**



2.52 g *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **80** (3.95 mmol, 1.00 eq) wurden in einem Gemisch aus Dichlormethan/Trifluoressigsäure (24 mL) bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Die gewünschte Verbindung konnte quantitativ als Trifluoracetatsalz **81** (2.58 g, 3.95 mmol) gewonnen werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.80-0.84 (m, 12H, H-21, H-27), 1.36-1.54 (m, 2H, H-20, H-26), 1.83-1.90 (m, 1H, H-25), 2.68-2.76 (m, 1H, H-25), 2.88-3.06 (m, 4H, H-4, H-12), 3.56 (s, 3H, H-1), 3.81-3.83 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.20 (dd,  $J = 7.14$  Hz,  $J = 8.82$  Hz, 1H, H-19), 4.44 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.61 (m, 1H, H $\alpha$ ), 7.12-7.28 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)), 8.02 (brs, 3H, H-28), 8.17 (d,  $^3J = 8.37$  Hz, 1H, NH), 8.35 (d,  $^3J = 8.97$  Hz, 1H, NH), 8.46 (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H, NH). Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

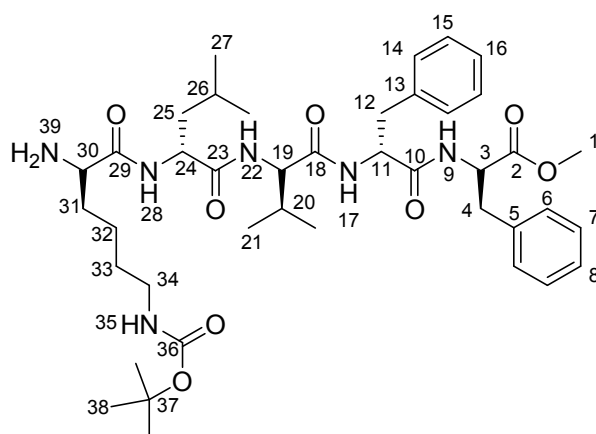
Darstellung von *N*-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>6</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-(*S*)-lysiny-(*S*)-leuciny-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **82**



Es wurden 2.26 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-(*S*)-lysine (5.93 mmol, 1.50 eq), 2.45 g HCTU (5.93 mmol, 1.50 eq), 2.55 g Cl-HOBt (15.01 mmol, 3.80 eq) und 2.30 mL 2,6-Lutidin (19.75 mmol, 5.00 eq) in absolutem Dichlormethan/DMF (25 mL) für zehn Minuten gerührt. Diese Reaktionslösung wurde gemäß der allgemeinen HCTU-Kupplungsvorschrift mit 2.58 g (*S*)-Leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester-trifluoracetat **81** (3.95 mmol, 1.00 eq) und 0.46 mL 2,6-Lutidin (3.95 mmol, 1.00 eq) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 5:1 gereinigt. Es wurden 1.20 g des farblosen Feststoffs **82** (1.33 mmol, 34 %) isoliert.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 0.66 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 6H, H-27), 0.78 (d, <sup>3</sup>J = 6.39 Hz, 3H, H-21<sub>α</sub>), 0.78 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H, H-21<sub>β</sub>), 1.22-1.54 (m, 20H, H-20, H-25, H-(31-34), H-38), 1.83-1.87 (m, 1H, H-26), 2.76-3.04 (m, 6H, H-4, H-12, H-41), 3.54 (s, 3H, H-1), 3.94-3.95 (m, 1H, H-24), 4.08 (dd, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 1H, H-19), 4.25-4.32 (m, 1H, H-30), 4.42 (m, 1H, H-3), 4.59 (m, 1H, H-11), 6.74 (t, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, 1H, H-35), 7.14-7.37 (m, 16H, H-(6-8, 14-16, 43-45), H-28), 7.58 (d, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, 1H, H-17), 7.94 (d, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 1H, H-39), 7.96 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, H-22), 8.39 (d, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, H-9). **Schmp.**: 192 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.06 in Dichlormethan/Methanol 30:1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Darstellung von *N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-(*S*)-lysiny-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninmethylester **83** (KLVFF)



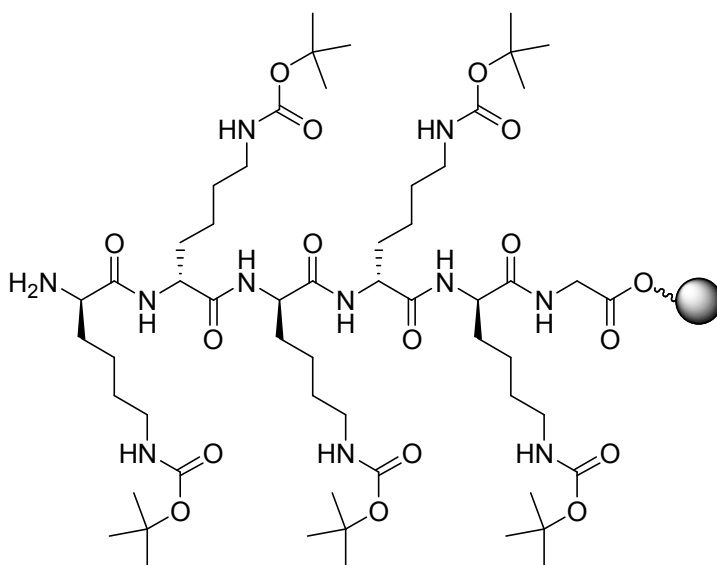
0.62 g der Verbindung **82** (0.69 mmol, 1.00 eq) wurden in einem Gemisch aus 75 mL Methanol und 50 mL Tetrahydrofuran gelöst, mit einer katalytischen Menge an Palladium auf Aktivkohle (10 mol%) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre solange gerührt, bis laut

Massenspektrometrie ein vollständiger Umsatz zu beobachten war. Die Lösung wurde über Kieselgur abfiltriert, das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet, um einen farblosen Feststoff **83** in einer Ausbeute von 96 % (502 mg, 0.66 mmol) zu erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 0.71 (d,  $^3J$  = 6.1 Hz, 6H, H-27), 0.828 (d,  $^3J$  = 6.3 Hz, 3H, H-21 $_{\alpha}$ ), 0.86 (d,  $^3J$  = 6.2 Hz, 3H, H-21 $_{\beta}$ ), 1.34-1.36 (m, 20H, H-25, H-26, H-(31-34), H-38), 1.83-1.87 (m, 1H, H-20), 2.68-3.00 (m, 6H, H-4, H-12, H-39), 3.55 (s, 3H, H-1), 4.11 (dd,  $^3J$  = 7.7 Hz,  $^3J$  = 7.4 Hz, 1H, H-19), 4.40-4.46 (m, 1H, H-24), 4.48-4.55 (m, 2H, H-3, H-11), 6.75 (t,  $^3J$  = 5.4 Hz, 1H, H-35), 7.17-7.40 (m, 10H, H-(6-8, 14-16)), 7.58 (d,  $^3J$  = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.84-8.00 (m, 2H, 2NH), 8.43 (d,  $^3J$  = 6.0 Hz, 1H, NH). **HRMS (ESI)**: ber. für  $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_8\text{Na}$ : 789.4527; gef.: 789.4569. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

#### 5.2.4 Manuelle Festphasensynthese der Pyrazolliganden

Synthese von festphasengebundenem Amino-(*S*)-lysiny(Boc)-(*S*)-lysiny(Boc)-(*S*)-lysiny(Boc)-(*S*)-lysiny(Boc)-(*S*)-lysiny(Boc)-(*S*)-glycin **84** (KKKKKG)



Die Darstellung des Hexapeptids erfolgte mittels manueller Fmoc-Festphasenpeptidsynthese. Als polymerer Träger kam ein mit Fmoc-Glycin vorbeladenes *Wang*-Harz mit einer mittleren Beladung von 0.78 mmol/g zum Einsatz. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren mit HBTU und DIEA wurde nach folgender Arbeitsweise durchgeführt: Je 8.00 eq Fmoc-Lys(Boc)-carbonsäure, 7.62 eq HBTU und 16.00 eq DIEA in DMF wurden pro Kupplungsschritt



verwendet. Die Vollständigkeit des jeweiligen Kupplungsschritts wurde mit dem Kaiser- und NF31-Test verifiziert. Die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF (2.50 mL). Das Harz wurde jeweils nach der Entschützung gründlich mit DMF gewaschen. Die einzelnen Kupplungsschritte sind in nachfolgender Tabelle ausführlich aufgelistet.

Operation	Reagenzien	Zeit [min]
1) Quellen des Harzes	DMF	80
2) Harz trocken ziehen		
3) Entschützen	Piperidin in DMF (20 %)	3
4) Harz trocken ziehen		
5) Entschützen	Piperidin in DMF (20 %)	7
6) Harz trocken ziehen		
7) Waschen	DMF	1
8) Kaiser- bzw. NF 31-Test		10
9) Kuppeln	Fmoc-Lys(Boc)-OH HBTU DIEA	30
10) Harz trocken ziehen		
11) Waschen	DMF	1
12) Kaiser- bzw. NF 31-Test		10
13) Wiederholen der Schritte 3-12 (fünfmal) und am Schluss wird das Harz im Hochvakuum getrocknet.		

Nur der vierte Kupplungsschritt musste wiederholt werden.

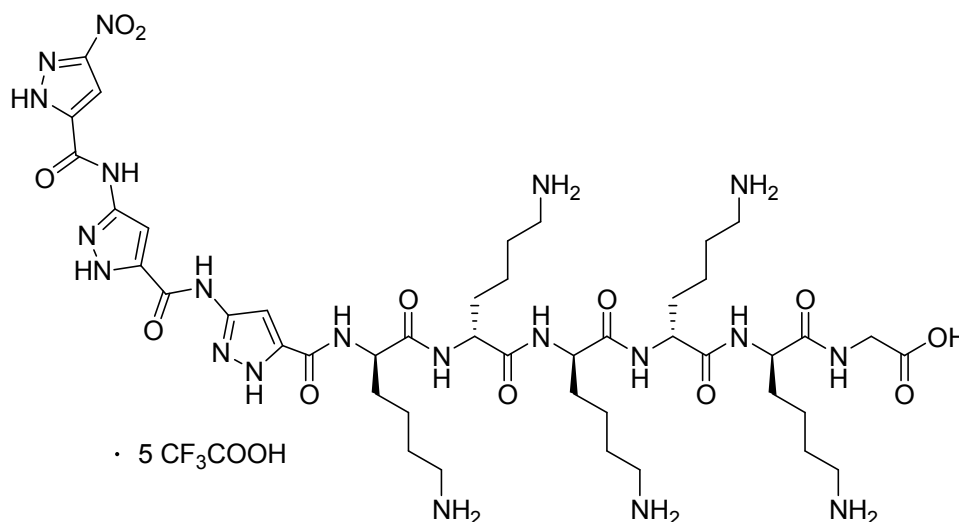
Kupplungseinwaagen:

Fmoc-Gly-Wang-Harz	0.20 mmol, 250 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	1.56 mmol, 721 mg
HBTU (0.5 M in DMF)	1.49 mmol, 3 mL
DIEA	3.12 mmol, 0.54 mL

Zur Überprüfung, ob das gewünschte Hexapeptid auf dem polymeren Träger immobilisiert vorlag, wurden einige getrocknete Polymerkugeln für drei Stunden in einer Mischung aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2 %) vom Harz abgespalten. Im Anschluss wurde die Lösung filtriert und das farblose Produkt aus Diethylether ausgefällt. Nach anschließender Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid mittels Massenspektrometrie untersucht.

**HRMS (ESI):**  $(1/2 M)^{2+}$  ber. für  $C_{32}H_{65}N_{11}O_7H$ : 358.7610; gef.: 358.7603.

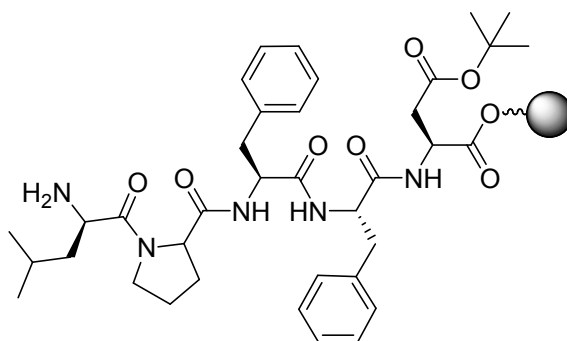
Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-glycin **59** (Trimer-KKKKKG)



Danach wurden zu 63 mg der Polymerkugeln **84** (49  $\mu$ mol) 36 mg der PMB- und *N*-terminal geschützte Verbindung **34** (49  $\mu$ mol, 1.00 eq), 20 mg HBTU (54  $\mu$ mol, 1.10 eq) und 17  $\mu$ L DIEA (98  $\mu$ mol, 2.00 eq) dazugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gekuppelt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Die Abspaltung des Pyrazolliganden vom Harz erfolgte unter Schütteln mit einem Cleavage-Cocktail (93 % Trifluoressigsäure, 5 % Triisopropylsilan und 2 % Wasser) für drei Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde filtriert und das Rohprodukt aus Diethylether ausgefällt. Nach anschließender Trocknung im Hochvakuum wurde der farblose Feststoff in Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und das Produkt aus Diethylether gefällt. Der Feststoff wurde fünfmal mit Diethylether gewaschen, getrocknet und in Dichlormethan aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde zügig unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang viermal wiederholt. Im Anschluss wurde das Produkt **59** im Hochvakuum getrocknet. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.23-1.33 (m, 12H), 1.51-1.56 (m, 14H), 1.63-1.74 (m, 6H), 2.75 (bs, 11H), 4.20-4.31 (m, 4H), 4.41-4.45 (m, 1H), 7.76 (bs, 16H), 7.94-7.99 (m, 2H), 8.02-8.18 (m, 3H), 8.26-8.28 (m, 1H), 11.47 (bs, 1H), 14.97 (bs, 1H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.0, 22.2, 26.4, 30.6, 39.2, 53.6, 53.7, 115.3, 117.7, 120.0, 162.6, 163.1, 163.4, 173.3, 173.5, 174.0. **Schmp.**: Zersetzung ab 138 °C. **HRMS (ESI)**: ber. für  $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{N}_{20}\text{O}_{12}$ : 1073.5711; gef.: 1073.5747,  $(1/2 \text{ M})^{2+}$ : 537.2913; gef.: 537.2910,  $(1/3 \text{ M})^{3+}$ : 358.5302; gef.: 358.5303. **Analytische HPLC**: 98 % Reinheit.

Synthese von festphasengebundenem Amino-(*S*)-leuciny-(*S*)-prolinyl-(*S*)-phenyl-alaninyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-tert.-butyl-asparaginsäure **85** (LPFFD)



Die Synthese des Pentapeptids wurde analog zu der von Verbindung **84** durchgeführt. Als polymerer Träger kam ein Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-Wang-Harz mit einer Beladung von 0.65 mmol/g zum Einsatz. Die Vollständigkeit des jeweiligen Kupplungsschritts wurde mit dem Kaiser- und NF31-Test und bei der Kupplung mit der Fmoc-geschützten Aminosäure Prolin mit dem Chloranil-Test überprüft.

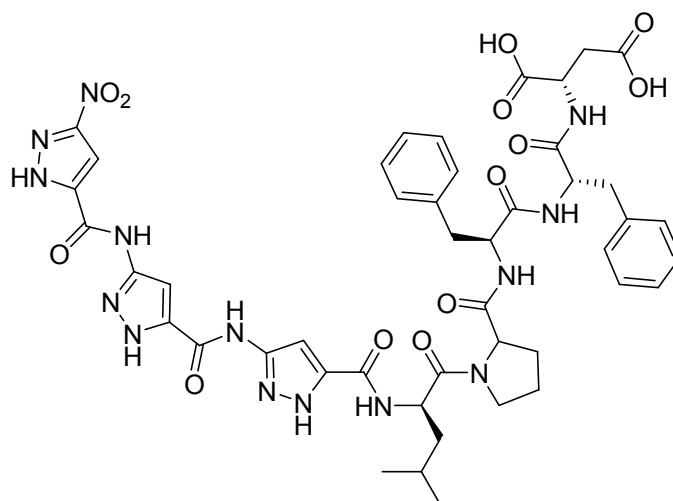
Kupplungseinwaagen:

Fmoc-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-Wang-Harz	0.15 mmol, 250 mg
Fmoc-Phe-OH	1.16 mmol, 449 mg
Fmoc-Phe-OH	1.16 mmol, 449 mg
Fmoc-Pro-OH	1.16 mmol, 391 mg
Fmoc-Leu-OH	1.16 mmol, 410 mg
HBTU (0.5 M in DMF)	1.11 mmol, 2.20 mL
DIEA	2.32 mmol, 0.40 mL

Nach vier Syntheseyklen wurde wie oben beschrieben eine Testabspaltung des Peptids vom Harz vorgenommen, um zu überprüfen, ob das Peptid LPFFD immobilisiert auf dem polymeren Träger vorlag. Das farblose Pentapeptid wurde mittels Massenspektrometrie untersucht.

**HRMS (ESI, neg.):** ber. für  $C_{33}H_{43}N_5O_8$ : 636.3039; gef.: 636.3018.

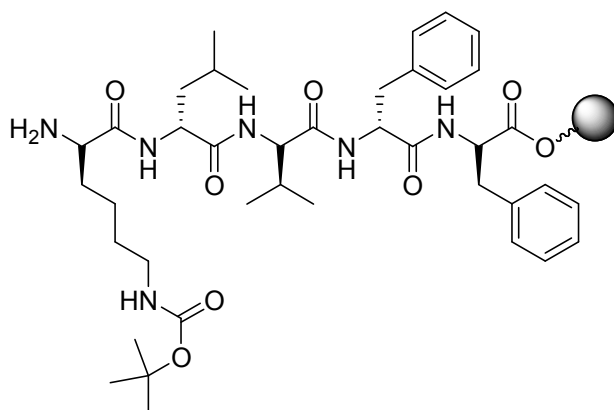
Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*S*)-leuciny-(*S*)-prolinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-asparaginsäure **60** (Trimer-LPFFD)



Zu 80 mg der Polymerkugeln (48  $\mu$ mol, 1.00 eq) wurden 35 mg der PMB- und N-terminal geschützte Verbindung **34** (48  $\mu$ mol, 1.00 eq), 20 mg HBTU (53  $\mu$ mol, 1.10 eq) und 16.80  $\mu$ L DIEA (96  $\mu$ mol, 2.00 eq) dazugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gekuppelt. Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt. Unter Schütteln wurde der Pyrazolligand vom Harz mit einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser im Verhältnis 93:5:2, für drei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten. Die Lösung wurde filtriert und das Rohprodukt aus Diethylether ausgefällt. Nach anschließender Trocknung im Ölpumpenvakuum wurde der farblose Feststoff in Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und das Produkt aus Diethylether gefällt. Der Feststoff wurde fünfmal mit Diethylether gewaschen, getrocknet und in Dichlormethan aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde zügig unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang viermal wiederholt. Das Produkt **60** wurde im Hochvakuum getrocknet. Eine Ausbeute des farblosen Feststoffs wurde nicht bestimmt.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.83-0.92 (m, 7H), 1.23 (s, 1H), 1.40-1.45 (m, 1H), 1.65-1.95 (m, 6H), 2.56-2.61 (m, 1H), 2.68-2.84 (m, 3H), 2.93-3.06 (m, 2H), 3.48-3.52 (m, 1H), 3.68-3.72 (m, 1H), 4.32-4.43 (m, 2H), 4.53-4.58 (m, 2H), 4.68-4.73 (m, 1H), 7.15-7.29 (m, 12H), 7.54 (bs, 1H), 7.78 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 7.94 (s, 1H), 8.03 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 8.36 (d,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H,  $\text{NH}_{\text{Amid}}$ ), 8.64 (bs, 1H), 11.07 (bs, 1H), 11.43 (s, 1H), 14.98 (s, 1H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 21.2, 23.1, 24.1, 24.3, 28.6, 35.9, 37.2, 37.5, 46.6, 48.5, 48.8, 56.4, 53.6, 59.2, 102.2, 126.0, 126.1, 127.9, 129.1, 129.2, 137.5, 138.6, 155.0, 170.4, 170.5, 107.6, 171.0, 171.5, 172.1. **Schmp.:** Zersetzung ab 198 °C. **HRMS (ESI, neg.):** ber. für  $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ : 993.3609; gef.: 993.3588,  $(1/2 \text{ M})^{2-}$ : ber. für  $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ : 496.1762; gef.: 496.1767,  $(1/3 \text{ M})^{3-}$ : ber. für  $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ : 330.4482; gef.: 330.4488.

Synthese von festphasengebundenem Amino-(*S*)-lysiny-(*S*)-leuciny-(*S*)-valiny-(*S*)-phenylalaniny-(*S*)-phenylalaninin **86** (KLVFF)



Die Synthese des Pentapeptids konnte sowohl analog zu der von Verbindung **84** als auch mittels automatisierter Festphasensynthese mit einem Mikrowellen-Peptidsynthesizer Liberty (CEM GmbH, Kamp-Lintfort) durchgeführt werden. Als polymerer Träger wurde ein mit Fmoc-Phenylalanin vorbeladenes Wang-Harz mit einer Beladung von 0.65 mmol/g verwendet. Die Vollständigkeit der Kupplungsschritte mit der Fmoc-geschützten Aminosäure Prolin wurde mit dem Chloranil-Test überprüft.<sup>[154]</sup>

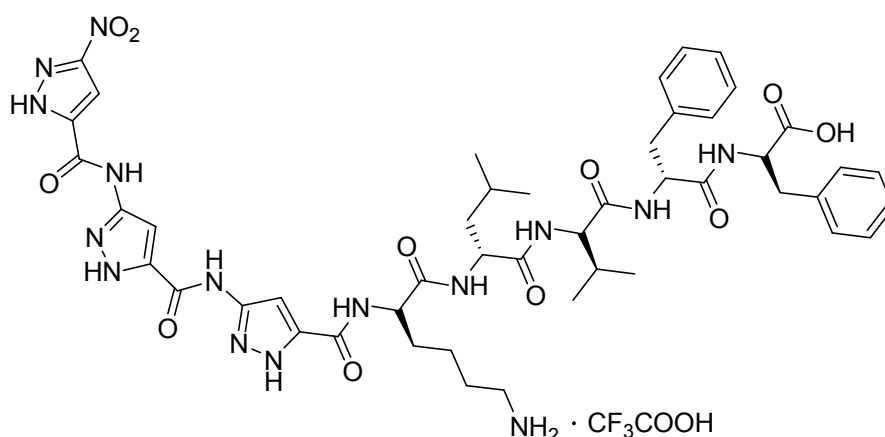
## Kupplungseinwaagen:

Fmoc-Phe- <i>Wang</i> -Harz	0.16 mmol, 250 mg
Fmoc-Phe-OH	1.30 mmol, 504 mg
Fmoc-Val-OH	1.30 mmol, 441 mg
Fmoc-Leu-OH	1.30 mmol, 459 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	1.30 mmol, 609 mg
HBTU (0.5 M in DMF)	1.24 mmol, 2.50 mL
DIEA	2.56 mmol, 0.45 mL

Die Kupplungen mit den Aminosäuren Valin und Leucin mussten jeweils einmal wiederholt werden. Nach der letzten Kupplung mit Lysin wurde wie oben beschrieben eine Testabspaltung des Peptids vom Harz vorgenommen, um zu überprüfen, ob das Peptid KLVFF immobilisiert auf dem polymeren Träger vorlag. Das farblose Pentapetid wurde mittels Massenspektrometrie untersucht.

**HRMS (ESI):** ber. für  $C_{35}H_{52}N_6O_6H$ : 653.4021; gef.: 653.4011.

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*S*)-lysiny-(*S*)-leuciny-(*S*)-valiny-(*S*)-phenylalaniny-(*S*)-phenylalaninin **61** (Trimer-KLVFF)



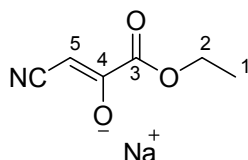
Zu 61 mg der Polymerkugeln (39  $\mu$ mol, 1.00 eq) wurden 29 mg der PMB- und *N*-terminal geschützte Verbindung **34** (39  $\mu$ mol, 1.00 eq), 14 mg HBTU (43  $\mu$ mol, 1.10 eq) und 14  $\mu$ L DIEA (78  $\mu$ mol, 2.00 eq) dazugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gekuppelt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Unter Schütteln wurde der Pyrazolligand vom Harz mit einem Cleavage-Cocktail (93 % Trifluoressigsäure, 5 % Triisopropylsilan und 2 %

Wasser) für drei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten. Die Lösung wurde filtriert und das Rohprodukt aus Diethylether ausgefällt. Nach anschließender Trocknung im Ölpumpenvakuum wurde der farblose Feststoff in Trifluoressigsäure gelöst und für fünf Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und das Produkt aus Diethylether gefällt. Der Feststoff wurde fünfmal mit Diethylether gewaschen, getrocknet und in Dichlormethan aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde zügig unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang viermal wiederholt. Im Anschluss wurde das farblose Produkt **61** im Hochvakuum getrocknet. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.70 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 6H), 0.79-0.82 (m, 4H), 0.85-0.87 (m, 4H), 1.32-1.47 (m, 5H), 1.50-1.60 (m, 3H), 1.67-1.74 (m, 2H), 1.83-1.89 (m, 1H), 2.72-2.77 (m, 2H), 2.90-2.99 (m, 2H), 3.03-3.07 (m, 1H), 4.08-4.11 (m, 1H), 4.32-4.36 (m, 1H), 4.43-4.47 (m, 2H), 4.54-4.59 (m, 1H), 7.15-7.28 (m, 11H), 7.67 (bs, 4H), 8.10 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 8.23 (d, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.15 (bs, 1H), 11.44 (s, 1H), 12.81 (bs, 1H), 13.22 (bs, 1H), 13.48 (bs, 1H), 14.98 (s, 1H). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.8, 19.1, 21.6, 23.0, 24.0, 26.5, 30.6, 36.6, 37.5, 38.6, 50.9, 53.3, 57.3, 102.2, 126.1, 126.3, 127.9, 128.1, 129.0, 137.2, 137.5, 155.0, 155.8, 170.3, 170.8, 171.5, 172.5. **Schmp.:** Zersetzung ab 188 °C. **HRMS (ESI, neg.):** ber. für C<sub>47</sub>H<sub>58</sub>N<sub>15</sub>O<sub>11</sub>: 1008.4446; gef.: 1008.4459, (1/2 M)<sup>2-</sup>: ber. für C<sub>47</sub>H<sub>58</sub>N<sub>15</sub>O<sub>11</sub>: 503.7186; gef.: 503.7196.

### 5.2.5 Synthese von 3-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäureethylester **90**

#### Synthese von Natrium-1-cyano-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-2-olat **87**

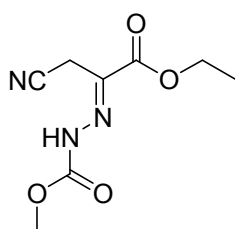


Unter Argon wurden 5.00 g Natrium (0.22 mol, 2.00 eq) in einem Lösungsmittelgemisch aus 80 mL absolutem Ethanol und 55 mL absolutem Diethylether gelöst. Nach dem Abkühlen auf 0 °C wurden langsam 16.07 g Oxalsäurediethylester (0.11 mol, 1.00 eq) in 5 mL Diethylether zugetropft und für 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Nachfolgend wurden 4.51 g Acetonitril (0.11 mol, 1.00 eq), gelöst in 5 mL Diethylether, hinzugefügt, die Reaktionslösung

auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert, im Hochvakuum getrocknet und es konnte in quantitativer Ausbeute die gewünschte Verbindung **87** (17.69 g, 0.11 mol) als beigefarbener Feststoff isoliert werden.

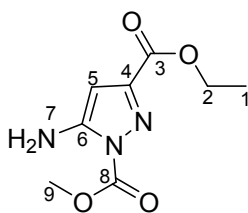
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 1.27 (t,  $^3J=7.1$  Hz, 3H, H-1), 4.21 (q,  $^3J=7.1$  Hz, 2H, H-2), 4.88 (s, 1H, H-5). **Schmp.**: 232-234 °C. **HRMS (ESI)**: ber. für  $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_3\text{Na}$ : 140.0342; gef.: 140.0322; ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ : 303.0588; gef.: 303.0569.

#### Synthese von Methyl-2-(3-cyano-1-ethoxy-1-oxopropan-2-yliden)hydrazinocarboxylat **88**



Zu einer Suspension aus 2.47 g der Verbindung **87** (15.14 mmol, 1.00 eq) und 150 mL absolutem Chloroform wurden 9 mL chlorwasserstoffgesättigter Essigsäureethylester hinzu gegeben. Nach Zugabe von 1.36 g Hydrazinoameisensäuremethylester (15.14 mmol, 1.00 eq) wurde das Gemisch für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der ungelöste Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde ein paarmal mit Essigsäureethylester versetzt und das Lösungsmittel zügig unter vermindertem Druck entfernt. Das hellgelbe ölige Rohprodukt **88** (2.70 g) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

#### Synthese von 5-Amino-pyrazol-1,3-dicarbonsäure-3-ethylester-1-methylester **89**

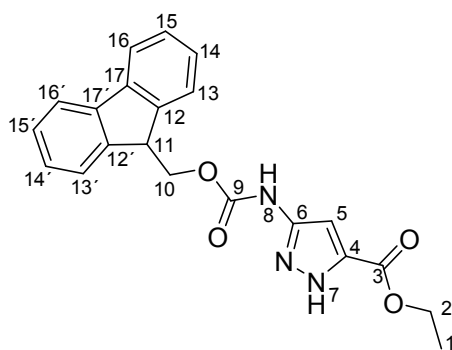


2.70 g des Rohprodukts **88** (12.66 mmol, 1.00 eq) wurden in 125 mL Acetonitril gelöst und mit 3.55 mL Triethylamin (25.32 mmol, 2.00 eq) versetzt. Nach zehn Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum eingeeengt und der verbleibende Feststoff aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Es konnten 1.89 g der farblosen Verbindung **89** (8.87 mmol, 59 %) über zwei Stufen isoliert werden.



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.36 (t, <sup>3</sup>J=7.1 Hz, 3H, H-1), 4.03 (s, 3H, H-9), 4.37 (q, <sup>3</sup>J=7.1 Hz, 2H, H-2), 5.48 (brs, 2H, H-7), 5.88 (s, 1H, H-5). **Schmp.:** 162 °C. **HRMS (ESI):** ber. für C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na: 236.0642; gef.: 236.0622; ber. für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Na: 449.1386; gef.: 449.1414.

Synthese von 3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-1H-pyrazol-5-carbonsäureethyl-ester **90**

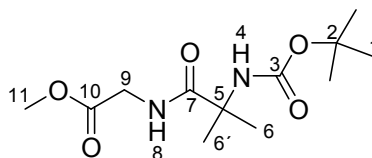


Unter Argon wurden 2.08 g der Verbindung **89** (9.78 mmol, 1.00 eq) in 65 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 2.78 g (9-Fluorenylmethyl)-chloroformiat (10.75 mmol, 1.10 eq) für 44 h bei 70 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der verbleibende Feststoff in Dichlormethan aufgenommen und säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1) gereinigt. In Form eines farblosen Feststoffs konnte Produkt **90** (3.59 g, 9.51 mmol) in einer Ausbeute von 98 % erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.37 (t, <sup>3</sup>J=7.1 Hz, 3H, H-1), 4.31 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 1H, H-11), 4.41 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-2), 4.52 (d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-10), 7.18 (s, 1H, H-5), 7.31 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-14, H-14'), 7.42 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-15, H-15'), 7.69 (d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-13, H-13'), 7.79 (d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-16, H-16'), 8.87 (brs, 1H, H-8), 12.64 (brs, 1H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-1), 47.2 (C-11), 62.2 (C-2), 67.6 (C-10), 99.2 (C-6), 120.2 (C-16, C-16'), 125.3 (C-13, C-13'), 127.3 (C-14, C-14'), 128.0 (C-15, C-15'), 141.5 (C-17, C-17'), 143.8 (C-12, C-12'), 153.7 (C-9), 161.0 (C-3). **Schmp.:** 198 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.31 in Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1. **HRMS (ESI):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na: 400.1297; gef.: 400.1266.

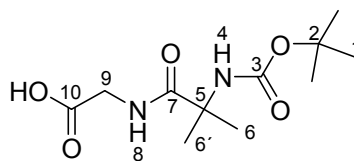
### 5.2.6 Synthese von *tert*.-Butyl-1-(2-(isopropylamino)-2-oxoethylamino)-2-methyl-1-oxopropylcarbamat **93**

#### Synthese von Methyl-2-(2-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-2-methylpropanamido)acetat **91**

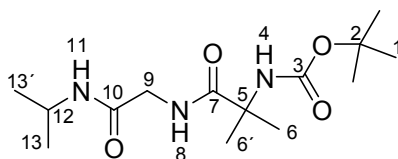


Unter Argon wurden 2.50 g 2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-2-methylpropansäure (12.30 mmol, 1.00 eq) in 80 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend wurden 1.35 mL *N*-Methylmorpholin (12.30 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben und die Reaktionslösung auf  $-25^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1.60 mL Chlorameisensäureisobutylester (12.30 mmol, 1.00 eq) wurde die Reaktion weitere zwei Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurden 1.55 g Glycin-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (12.30 mmol, 1.00 eq) und nochmals 1.00 eq *N*-Methylmorpholin (1.35 mL, 12.30 mmol) dem Gemisch hinzugefügt. Es wurden weitere drei Stunden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gerührt und die Lösung über Nacht langsam erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Der über Nacht ausgefallene Feststoff wurde filtriert und im Hochvakuum getrocknet. In Form farbloser Kristalle konnten 2.35 g des Produkts **91** (8.57 mmol, 70 %) isoliert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.42 (s, 9H, H-1), 1.49 (s, 6H, H-6, H-6'), 3.73 (s, 3H, H-11), 4.03 (d,  $^3J=5.2$  Hz, 2H, H-9), 5.00 (s, 1H, H-8), 6.97 (br s, 1H, H-4).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.6 (C-6, C-6'), 28.2 (C-1), 41.4 (C-9), 52.2 (C-11), 56.7 (C-5), 154.7 (C-3), 170.4 (C-10), 174.9 (C-7). **Schmp.:** 112.0-112.6  $^{\circ}\text{C}$ . **R<sub>f</sub>:** 0.27 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI):** ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ : 297.1421; gef.: 297.1458.

Synthese von 2-(2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-2-methylpropanamido)essigsäure **92**

2.03 g Boc-Aib-Gly-OMe **91** (7.40 mmol, 1.00 eq) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus 12 mL Dioxan und 18 mL Methanol gelöst. Unter Eiskühlung wurden 7.50 mL 2 M Natronlauge (15.00 mmol, 2.03 eq) zugetropft, die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 1 M Salzsäure auf pH = 6-7 angesäuert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum unter vermindertem Druck entfernt. Das farblose Rohprodukt **92** (1.92 g) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Synthese von *tert.*-Butyl-1-(2-(isopropylamino)-2-oxoethylamino)-2-methyl-1-oxopropylcarbammat **93**

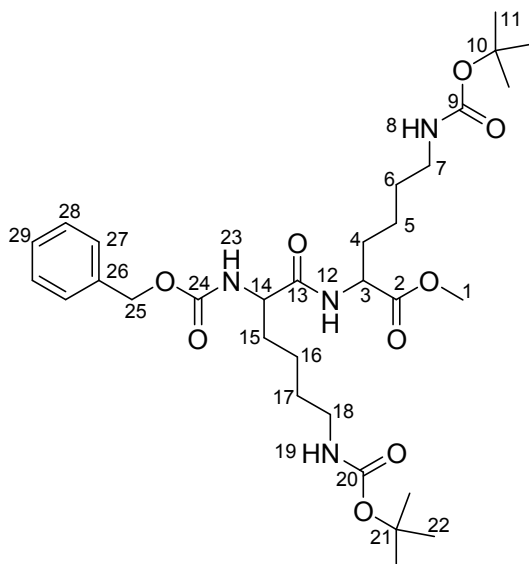
Unter Argon wurden 1.90 g Boc-Aib-Gly-OH **92** (7.30 mmol, 1.00 eq) in 45 mL Dichlormethan und 15 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 3.10 g Cl-HOBt (18.28 mmol, 2.50 eq), 3.02 g HCTU (7.30 mmol, 1.00 eq) und 2.55 mL 2,6-Lutidin (21.89 mmol, 3.00 eq) wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 0 °C voraktiviert. Im Anschluss wurde die Suspension mit 0.63 mL Isopropylamin (7.33 mmol, 1.00 eq) versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Die organische Phase wurde nach 16 Stunden Rühren mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das über Nacht auskristallisierte Produkt wurde im Hochvakuum getrocknet und es verblieben 1.58 g der gewünschten Verbindung **93** (5.24 mmol, 72%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.05 (d,  $^3J$  = 6.6 Hz, 6H, H-13, H-13'), 1.27 (s, 6H, H-6, H-6'), 1.41 (s, 9H, H-1), 3.52 (d,  $^3J$  = 5.6 Hz, 2H, H-9), 3.80-3.87 (m, 1H, H-12),

7.29 (brs, 1H, H-4), 7.35 (d,  $^3J = 5.9$  Hz, 1H, H-11), 8.04 (brs, 1H, H-8).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 22.1$  (C-13, C-13'), 25.1 (C-6, C-6'), 28.1 (C-1), 42.9 (C-9), 55.6 (C-5), 78.4 (C-2), 155.1 (C-3), 168.0 (C-10), 174.4 (C-7). **Schmp.:** 190.7-191.5 °C. **R<sub>f</sub>:** 0.15 in *n*-Pentan/Essigsäureethylester 1:1. **HRMS (ESI):** ber. für  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$ : 300.1929; gef.: 300.1936.

### 5.2.7 Synthese von Dilysin

Synthese von  $N^\alpha$ -(Benzyloxycarbonyl)- $N^\epsilon$ -(*tert*.-butoxycarbonyl)-(*S*)-lysinyln- $N^\epsilon$ -(*tert*.-butoxycarbonyl)-(*S*)-lysin-carbonsäuremethylester **94**

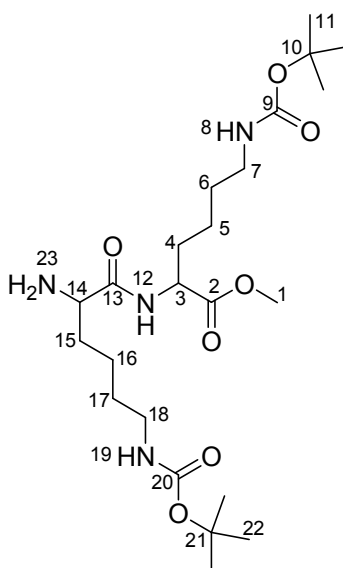


705 mg Z-Lysin(Boc)-OH (1.85 mmol, 1.10 eq) wurden unter Schutzgas in 3 mL Dichlormethan und 1 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Unter Eiskühlung wurde die Reaktionslösung mit 714 mg Cl-HOBt (4.21 mmol, 2.50 eq), 767 mg HCTU (1.85 mmol, 1.10 eq) und 0.60 mL 2,6-Lutidin (5.15 mmol, 3.06 eq) versetzt und für zehn Minuten gerührt. Anschließend wurden 500 mg  $\text{H}_2\text{N}$ -Lysin(Boc)-OMe Hydrochlorid (1.68 mmol, 1.00 eq) in wenig desgleichen Lösungsmittelgemisches und einem weiteren Äquivalent 2,6-Lutidin (0.20 mL, 5.15 mmol, 3.06 eq) gelöst und zu dem Gemisch hinzugegeben. Die Lösung wurde für 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Extraktion der organischen Phase mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung und Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde an einer mit Kieselgel befüllten

Säule chromatographisch (Dichlormethan/Methanol 50:1) gereinigt. In Form eines farblosen Feststoffs konnte Verbindung **94** (642 mg, 1.03 mmol) in 61 %iger Ausbeute erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.25-1.45 (m, 26H, H-5, H-6, H-11, H-16, H-17, H-22), 1.64-1.70 (m, 2H, H-4, H-15), 1.81-1.87 (m, 2H, H-4, H-15), 3.05-3.12 (m, 4H, H-7, H-18), 3.73 (s, 3H, H-1), 4.18-4.21 (m, 1H, H-14), 4.53-4.56 (m, 1H, H-3), 4.72/4.76 (2brs, 2H, H-8, H-19), 5.10 (s, 2H, H-25), 5.60 (brs, 1H, H-23), 6.70 (brs, 1H, H-12), 7.28-7.34 (m, 5H, H-27, H-28, H-29). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 22.2 (C-5), 22.3 (C-6), 28.4 (C-11, C-22), 29.3 (C-16), 29.5 (C-17), 31.6 (C-4, C-15), 39.7 (C-7), 39.9 (C-18), 52.0 (C-3), 52.4 (C-1), 54.7 (C-14), 67.0 (C-25), 128.1 (C-27, C-28), 128.5 (C-29), 136.2 (C-26), 156.1 (C-10, C-21), 156.2 (C-24), 171.7 (C-13), 172.6 (C-2). **Schmp.**: 103.3 °C. **R<sub>f</sub>**: 0.18 in Dichlormethan/Methanol 50:1. **HRMS (ESI)**: ber. für C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Na: 645.3470; gef.: 645.3463; ber. für C<sub>62</sub>H<sub>100</sub>N<sub>8</sub>O<sub>18</sub>Na: 1267.7044; gef.: 1267.7087.

Synthese von Amino-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*.-butoxycarbonyl)-(S)-lysinyln-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*.-butoxycarbonyl)-(S)-lysinsäuremethylester **95**

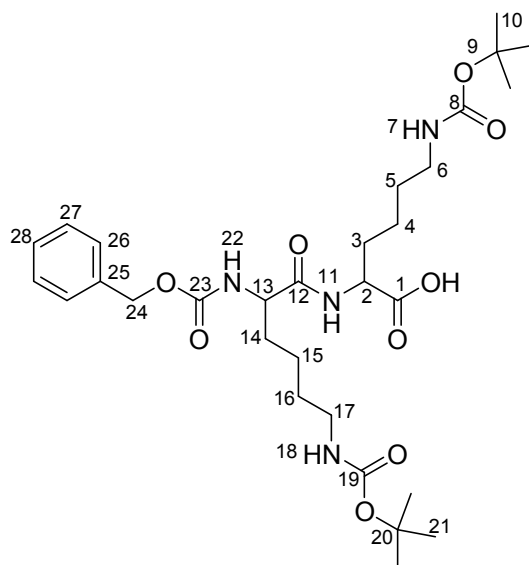


1.67 g Z-Lysin(Boc)-Lysin(Boc)-OMe **94** (2.68 mmol, 1.00 eq) wurden in 45 mL Methanol gelöst, mit 200 mg Pd/C (10 mol%) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre 16 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck im Membranpumpenvakuum entfernt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum konnten 1.31 g des farblosen Feststoffs **95** (2.68 mmol, 100 %) isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.43-1.57 (m, 26H, H-5, H-6, H-11, H-16, H-17, H-22), 1.65-1.93 (m, 4H, H-4, H-15), 3.06-3.16 (m, 4H, H-7, H-18), 3.48 (s, 3H, H-1), 3.99-4.03

(m, 1H, H-14), 4.56-4.59 (m, 1H, H-3), 4.69 (bs, 2H, H-8, H-19), 6.32 (brs, 1H, H-12). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ [ppm] = 21.5, 28.2, 29.1, 30.3, 32.6, 34.3, 53.8, 77.2, 124.8, 139.1, 155.4, 167.8. **Schmp.**: 185.3 °C. **HRMS (ESI)**: ber. für C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>H: 489.3283; gef.: 489.3282; ber. für C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na: 511.3102; gef.: 511.3101.

Synthese von *N*<sup>α</sup>-(Benzyloxycarbonyl)-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*.-butoxycarbonyl)-(*S*)-lysinyll-*N*<sup>ε</sup>-(*tert*.-butoxycarbonyl)-(*S*)-lysine-carbonsäure **96**

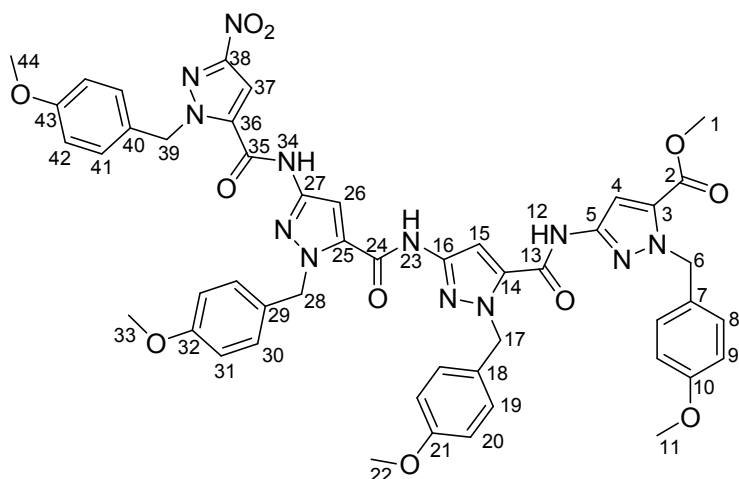


1.14 g Z-Lysin(Boc)-Lysin(Boc)-OMe **94** (1.83 mmol, 1.00 eq) wurden in 15 mL Methanol und 20 mL Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 166 mg Lithiumhydroxid (6.93 mmol, 3.79 eq) und 5 mL Wasser wurde die Reaktionslösung für 15 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit 1 M Salzsäure auf pH = 5 angesäuert und fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es verblieb ein hellgelbes Öl **96** (0.78 g, 1.28 mmol, 70 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 1.34-1.56 (m, 26H, H-10, H-21), 1.63-1.84 (m, 4H, H-4, H-15), 3.03-3.17 (m, 4H, H-7, H-18), 4.24-4.50 (m, 2H, H-14), 4.70 (s, 2H, H-24), 6.24 (brs, 1H, H-23), 6.36 (brs, 1H, H-12), 7.27-7.37 (m, 5H, H-26, H-27, H-28). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 22.6, 28.3, 29.4, 38.5, 40.3, 53.1, 64.9, 79.2, 79.3, 80.6, 126.9, 127.4, 128.1, 128.2, 128.4, 140.9, 156.3, 158.7, 165.7, 176.5. **HRMS (ESI)**: ber. für C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Na: 631.3314; gef.: 631.3315.

### 5.2.8 Synthese von Trimer-Säure **98**

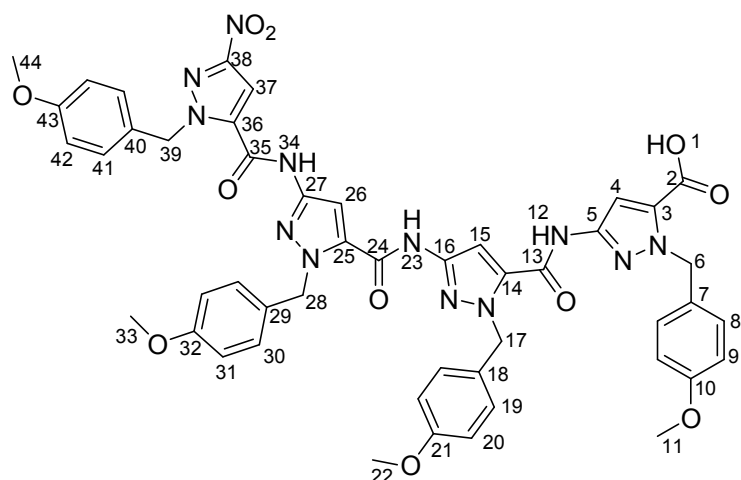
Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **97**



Zu einer Lösung aus 0.60 g der Verbindung **28** (1.18 mmol, 1.10 eq) in 40 mL absolutem Chloroform wurden 1.50 mL Diisopropylethylamin (8.62 mmol, 8.00 eq) langsam zugetropft. Nach der Zugabe von 1.18 g PyClop (2.80 mmol, 2.60 eq) und 0.53 g 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **27** (1.08 mmol, 1.00 eq) wurde das Reaktionsgemisch für zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt und es konnten 0.21 g des gewünschten Produkts **97** (0.21 mmol, 21%) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.71-3.72 (3s, 12H, H-11, H-22, H-33, H-44), 3.86 (s, 3H, H-1), 5.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.87-6.91 (m, 8H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.18-7.22 (m, 7H, CH<sub>Pyrazol</sub>, CH<sub>Aromat</sub>), 7.27-7.29 (m, 2H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.69 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.72 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.99 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.35 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.39 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.51 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 52.1, 53.1, 55.0, 59.7, 113.7, 113.8, 113.9, 128.7, 128.8, 129.3, 153.5, 159.0, 172.1. Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>[84]</sup>

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure **98**



108 mg des tetrameren Pyrazolbausteins **97** (0.11 mmol, 1.00 eq) wurden in 8 mL Tetrahydrofuran und 5 mL Methanol suspendiert. Anschließend wurden zu dem Reaktionsgemisch 2 mL Wasser und 30 mg Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 11.39 eq) hinzugegeben und für drei Tage unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 1 M Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Als hellgelber Feststoff konnten 79 mg von **98** (0.08 mmol, 74 %) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 3.71-3.72 (3s, 12H, H-11, H-22, H-33, H-44), 5.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Benzyl), 6.87-6.91 (m, 8H, CH<sub>Aromat</sub>), 7.15-7.28 (m, 9H, CH<sub>Pyrazol</sub>, CH<sub>Aromat</sub>), 7.67 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.72 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 7.98 (s, 1H, CH<sub>Pyrazol</sub>), 11.29 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.34 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>), 11.51 (brs, 1H, NH<sub>Amid</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 20.9, 21.5, 22.1, 25.8, 30.3, 34.3, 43.7, 45.7, 45.8, 53.0, 53.1, 55.0, 100.8, 101.0, 105.0, 113.7, 113.8, 114.0, 124.8, 127.9, 128.6, 128.7, 128.8, 129.3, 129.5, 129.6, 132.4, 133.9, 134.1, 134.3, 136.7, 139.1, 145.2, 145.4, 153.5, 155.4, 156.8, 157.1, 158.6, 159.0, 160.3.

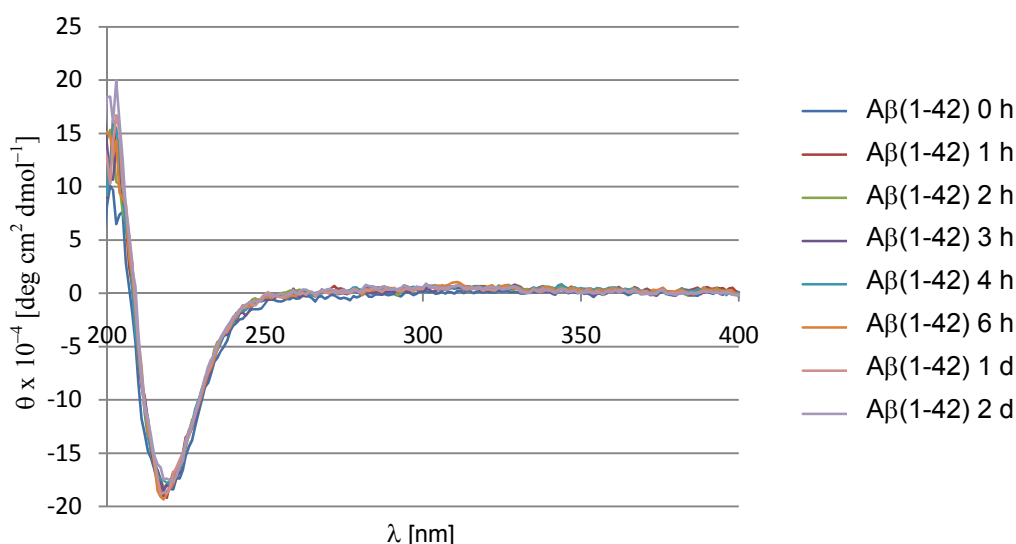


### 5.3 CD-Spektren

Die Anfertigung der CD-Spektren erfolgte mit einem J-810 Spektropolarimeter der Firma *Jasco*. Die zu untersuchenden Proben bestanden aus 10  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42), 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.3), 2 % HFIP und 10  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Liganden. Die Spektren wurden in einer 1 cm Küvette aufgenommen. Verwendete Geräteeinstellungen: *Start*: 400 nm, *Ende*: 190 nm, *data pitch*: 1 nm, *Response*: 1 s, *Sensitivity*: standard, *Scanning speed*: 100 nm/min, *Accumulation*: 1, *Temperatur*: 22 °C.

#### A $\beta$ (1-42)-Peptid

Eine 500  $\mu\text{M}$  Stammlösung des A $\beta$ (1-42)-Peptids in 100 % HFIP wurde mit 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.3) auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt.



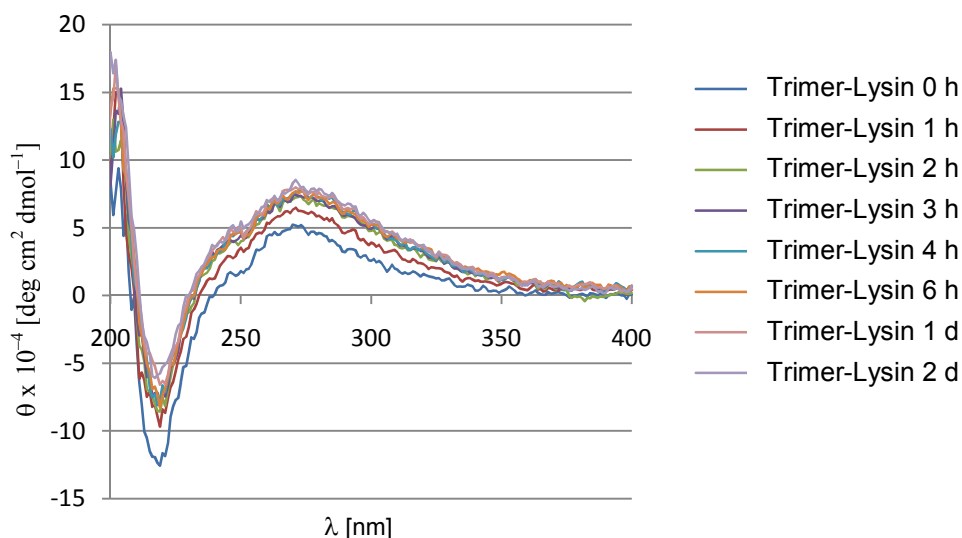
**Abb. 90:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42)-Peptids. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen.

#### A $\beta$ (1-42)-Peptid + Trimer-Lysin **45**

Eine 500  $\mu\text{M}$  Stammlösung von Trimer-Lysin **45** in Wasser (100 %) wurde mit 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.3) auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt.

$c(\text{A}\beta(1-42)) = 10 \mu\text{M}$

$c(\text{Trimer-Lysin } \mathbf{45}) = 10 \mu\text{M}$



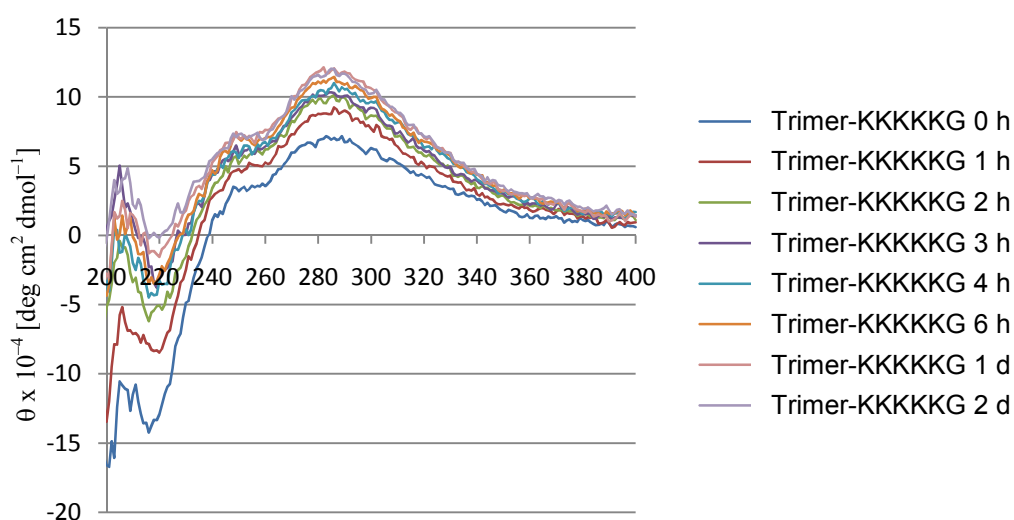
**Abb. 91:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42)-Peptids mit 1 eq Trimer-Lysin **45**. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen.

#### A $\beta$ (1-42)-Peptid + Trimer-KKKKKKG **59**

Eine 500  $\mu$ M Stammlösung von Trimer-KKKKKKG **59** in Wasser (100 %) wurde mit 5  $\mu$ M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.3) auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M verdünnt.

$c(\text{A}\beta(1-42)) = 10 \mu\text{M}$

$c(\text{Trimer-KKKKKKG } \mathbf{59}) = 10 \mu\text{M}$



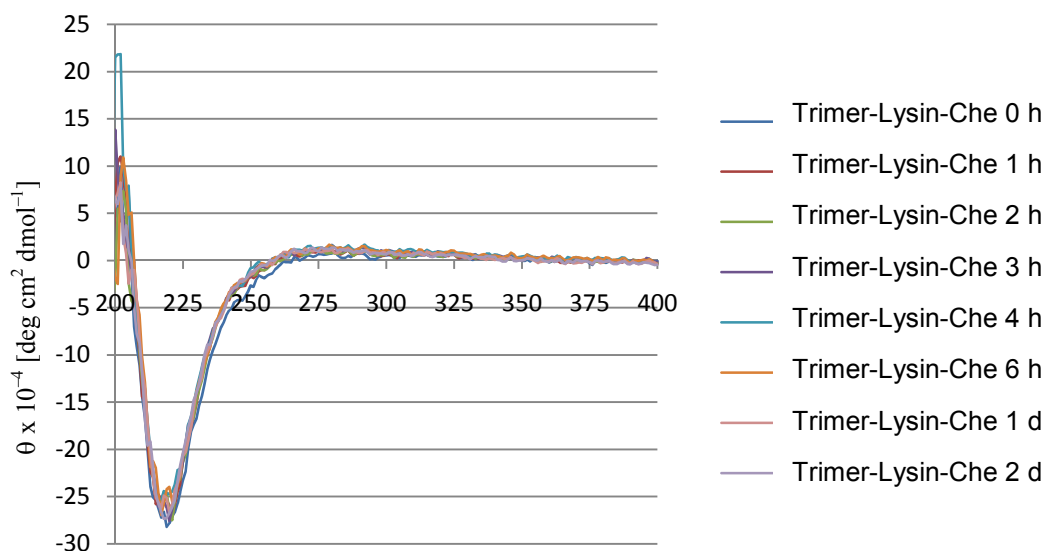
**Abb. 92:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42)-Peptids mit 1 eq Trimer-KKKKKKG **59**. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen.

A $\beta$ (1-42)-Peptid + Trimer-Lysin-Che **53**

Eine 500  $\mu\text{M}$  Stammlösung von Trimer-Lysin-Che **53** in HFIP (100 %) wurde mit 5  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.3) auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt.

$c(\text{A}\beta(1-42)) = 10 \mu\text{M}$

$c(\text{Trimer-Lysin-Che } \mathbf{53}) = 10 \mu\text{M}$



**Abb. 93:** CD-Spektren des A $\beta$ (1-42)-Peptids mit 1 eq Trimer-Lysin-Che **53**. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen.

#### 5.4 Thioflavin T-Messungen

Die Thioflavin T (ThT) Fluoreszenzmessungen wurden in einer 384-Well Platte (*Nunc GmbH*, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 37 °C, einer Excitationswellenlänge von 446 nm (Bandbreite: 9 nm) und einer Emissionswellenlänge von 490 nm mit einer Bandbreite von 20 nm. Jeder Messpunkt wurde über 40 Lichtblitze gemittelt. Bei der Aufnahme von Kinetiken wurden vor jedem Zyklus die Proben für 30 s bei einer mittleren Intensität orbital geschüttelt. Die 384-Well-Platte wurde dabei mit einer transparenten, DMSO-beständigen Folie (*Nunc GmbH*, Wiesbaden, Deutschland) abgedeckt. Die einzelnen Proben waren wie folgt zusammengesetzt: 33 µM Aβ(1-40) bzw. Aβ(1-42) in 1 x PBS, 10 µM ThT, 10.7 % DMSO und verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindung.

Das für die Aggregationsansätze verwendete Aβ-Peptid (Aβ(1-40) bzw. Aβ(1-42)) wurde von der Firma *Bachem* (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Das Aβ(1-40)-Peptid wurde in 100 % DMSO gelöst, wobei die Konzentration der Stammlösung 495 µM betrug. Das Peptid wurde in je 4 µL Aliquots bei – 20 °C gelagert. Das Aβ(1-42)-Peptid wurde zunächst in HFIP über Nacht gelöst und anschließend lyophilisiert, in DMSO gelöst (495 µM), aliquotiert (4 µL je Aliquot) und bei – 20 °C gelagert.

Generell wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

$c(\text{A}\beta(1-42)) = 495 \text{ }\mu\text{M}$  in DMSO

$c(\text{Ligand}) = 4.95 \text{ mM}$  in DMSO

$c(\text{ThT}) = 62.75 \text{ }\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest.})}$

#### Inhibierungsansätze der Liganden mit Aβ(1-40)

Die Aggregationsansätze wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden gemessen und die Ergebnisse sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %). Die Endkonzentrationen waren wie folgt:

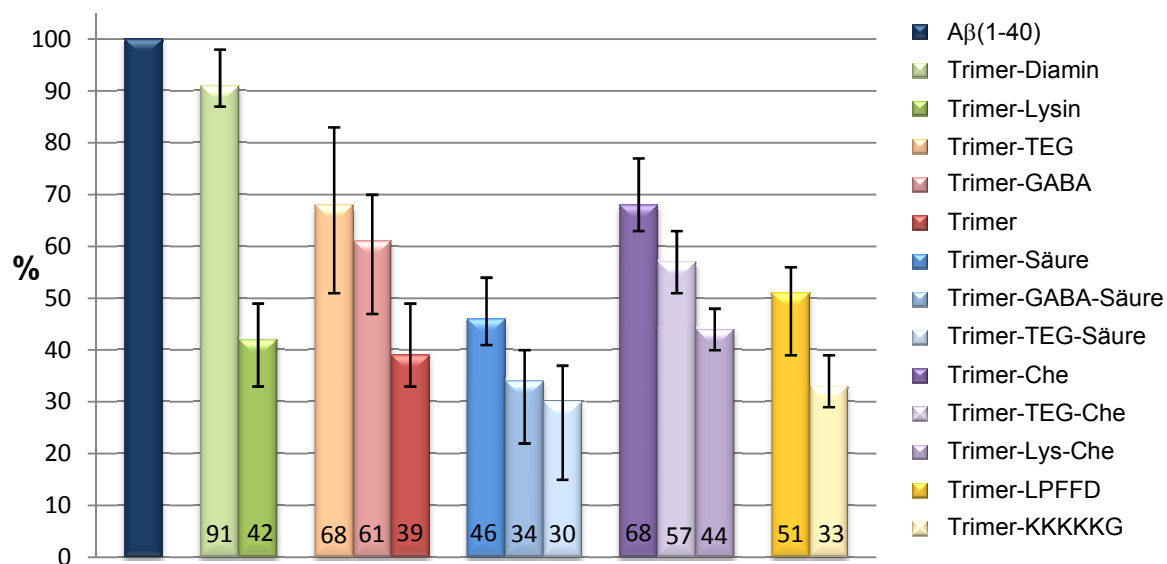
$c(\text{A}\beta(1-42)) = 33 \text{ }\mu\text{M}$

$c(\text{Ligand}) = 198 \text{ }\mu\text{M}$

$c(\text{ThT}) = 10 \text{ }\mu\text{M}$

Das Gesamtvolumen betrug pro Ansatz 60  $\mu\text{L}$ , davon 4  $\mu\text{L}$  A $\beta$ (1-42) (495  $\mu\text{M}$ ), 6  $\mu\text{L}$  10 x PBS, 9.50  $\mu\text{L}$  ThT (62.75  $\mu\text{M}$ ) und 2.40  $\mu\text{L}$  Ligand (4.95 mM). Dabei wurde der Ligand immer zuerst zu den A $\beta$ -Aliquots zugegeben.

**Abbildung 94** zeigt die inhibierenden Effekte der Liganden auf die A $\beta$ (1-40)-Aggregation.



**Abb. 94:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die A $\beta$ (1-40)-Aggregation. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

Es wurde eine Messung mit je drei bzw. vier Ansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** dargestellt.

**Tabelle 4:** Messwerte der Inhibierungsansätze mit A $\beta$ (1-40) und dem jeweiligen Liganden.

Verbindung	Messung (in %)	Mittelwert (in %)
Trimer-Diamin <b>43</b>	91	91
	102	
	81	
Trimer-Lysin <b>45</b>	32	42
	36	
	58	
Trimer-TEG <b>55</b>	69	68
	53	
	87	
Trimer-GABA <b>38</b>	50	61
	56	
	78	
Trimer <b>21</b>	33	39
	49	
	34	

Trimer-Säure <b>36</b>	42	46
	54	
	44	
Trimer-GABA-Säure <b>40</b>	18	34
	50	
	34	
Trimer-TEG-Säure <b>62</b>	57	30
	21	
	13	
Trimer-Che <b>47</b>	63	68
	63	
	77	
Trimer-TEG-Che <b>58</b>	63	57
	51	
	53	
	60	
Trimer-Lysin-Che <b>53</b>	40	44
	40	
	47	
	48	
Trimer-LPFFD <b>60</b>	48	51
	60	
	61	
	38	
Trimer-KKKKKKG <b>59</b>	35	33
	38	
	29	
	31	

#### Inhibierungsansätze der Liganden mit A $\beta$ (1-42)

Die Aggregationsansätze wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden gemessen und die Ergebnisse sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %). Die Endkonzentrationen waren wie folgt:

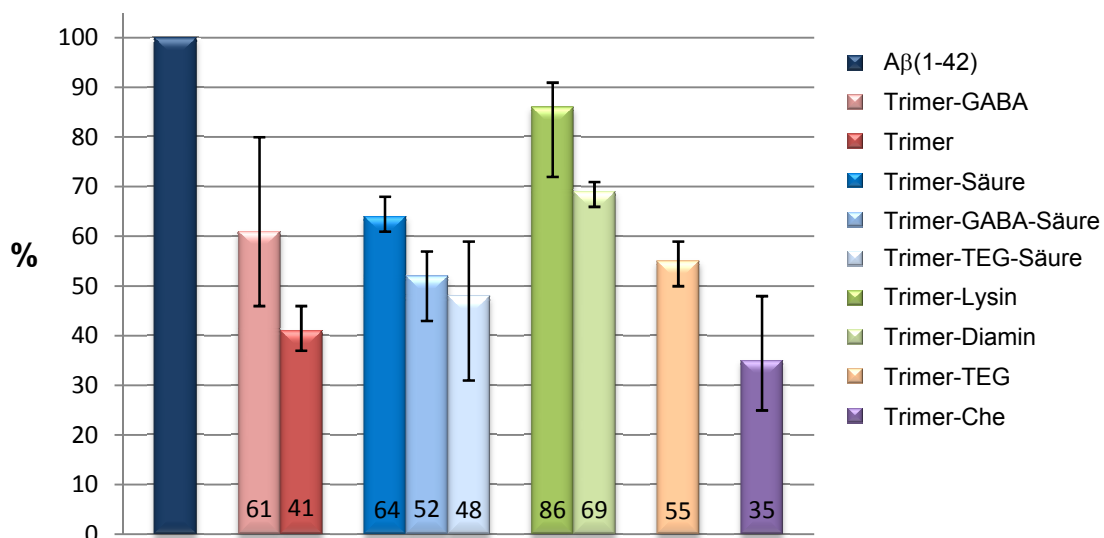
$$c(\text{A}\beta(1-42)) = 33 \mu\text{M}$$

$$c(\text{Ligand}) = 198 \mu\text{M}$$

$$c(\text{ThT}) = 10 \mu\text{M}$$

Das Gesamtvolumen betrug pro Ansatz 60  $\mu\text{L}$ , davon 4  $\mu\text{L}$  A $\beta$ (1-42) (495  $\mu\text{M}$ ), 6  $\mu\text{L}$  10 x PBS, 9.50  $\mu\text{L}$  ThT (62.75  $\mu\text{M}$ ) und 2.40  $\mu\text{L}$  Ligand (4.95 mM). Dabei wurde der Ligand immer zuerst zu den A $\beta$ -Aliquots zugegeben.

**Abbildung 95** zeigt die inhibierenden Effekte der Liganden auf die A $\beta$ (1-42)-Aggregation.



**Abb. 95:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die Aggregation des Aβ(1-42)-Peptids. Die Resultate sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %).

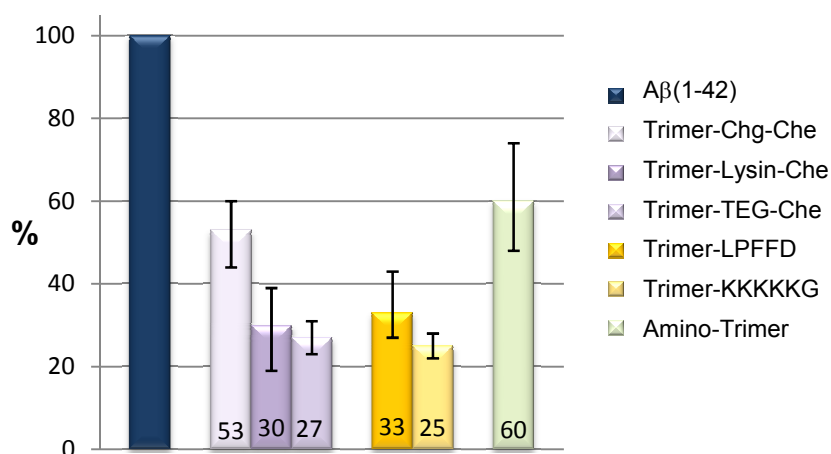
Es wurden drei Messungen mit je vier Ansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5** dargestellt.

**Tabelle 5:** Messwerte der Inhibierungsansätze mit Aβ(1-42) und dem jeweiligen Liganden.

Verbindung	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert der drei Messungen (in %)
Trimer-Lysin <b>45</b>	98	97	85	86
	81	79	80	
	88	80	81	
	95	90	83	
Trimer-Diamin <b>43</b>	52	89	62	69
	49	42	70	
	98	46	76	
	83	64	98	
Trimer-GABA <b>38</b>	63	70	80	61
	71	48	32	
	62	78	76	
	76	46	34	
Trimer-GABA-Säure <b>40</b>	63	30	47	52
	71	46	48	
	62	63	36	
	66	53	36	
Trimer-Säure <b>36</b>	55	57	56	64
	63	71	65	
	79	58	69	
	52	67	70	
Trimer <b>21</b>	40	49	48	41
	41	36	41	
	40	47	25	
	36	44	43	
Trimer-TEG <b>55</b>	54	63	-	55
	59	56	-	
	46	55	-	
	39	68	-	

Trimer-TEG-Säure <b>62</b>	22	60	54	48
	39	71	56	
	27	54	68	
	25	40	60	
Trimer-Che <b>47</b>	43	32	36	35
	46	31	28	
	46	33	30	
	32	28	40	

Bei den nachstehenden Verbindungen wurde nur eine Messung mit je vier Ansätzen durchgeführt. **Abbildung 96** zeigt den Mittelwert der Liganden.



**Abb. 96:** Inhibierender Effekt der synthetisierten Liganden auf die Aggregation des Aβ(1-42)-Peptids. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

In **Tabelle 6** sind die Messwerte gezeigt.

**Tabelle 6:** Messwerte der Inhibierungsansätze mit Aβ(1-42) und dem jeweiligen Liganden.

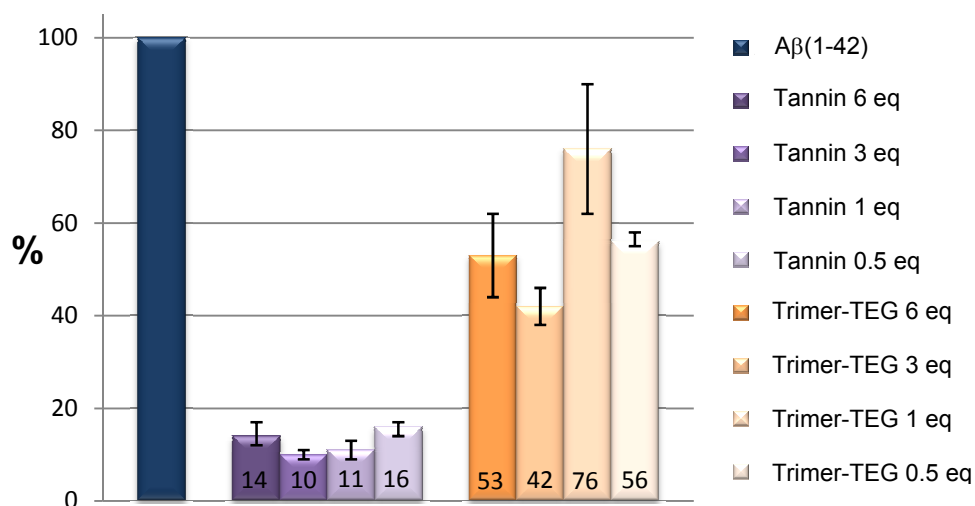
Verbindung	Messung (in %)	Mittelwert (in %)
Amino-Trimer <b>35</b>	72	60
	57	
	63	
	48	
Trimer-Chg-Che <b>50</b>	44	53
	57	
	50	
	60	
Trimer-LPFFD <b>60</b>	27	33
	29	
	42	
	31	
Trimer-Lys-Che <b>53</b>	25	30
	19	
	35	
	39	
Trimer-TEG-Che <b>58</b>	31	27
	24	
	27	
	26	



Trimer-KKKKKKG <b>59</b>	28	25
	24	
	25	
	22	

### Inhibierungsansätze des Liganden **55** bzw. von Tannin **9** mit A $\beta$ (1-42)

Zu den Ansätzen mit dem A $\beta$ (1-42)-Peptid wurden unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Liganden gegeben. Die Konzentrationen der Liganden betrugen 198  $\mu$ M (6 eq), 99  $\mu$ M (3 eq), 33  $\mu$ M (1 eq) und 16.5  $\mu$ M (0.5 eq). Die Aggregationsansätze wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden gemessen und die Ergebnisse sind in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrolle (100 %). In **Abbildung 97** sind die inhibierenden Effekte gezeigt.



**Abb. 97:** Inhibierender Effekt von Tannin **9** und Trimer-TEG **55** auf die A $\beta$ (1-42)-Aggregation. Die Liganden wurden jeweils in Konzentrationen von 198  $\mu$ M, 99  $\mu$ M, 33  $\mu$ M und 16.5  $\mu$ M zu einem 33  $\mu$ M A $\beta$ (1-42)-Aggregationansatz gegeben.

**Tabelle 7** führt die Messwerte der einzelnen Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen auf. Pro Messung wurden drei Ansätze untersucht.

**Tabelle 7:** Messwerte der Inhibierungsansätze mit A $\beta$ (1-42) und den Liganden **55** und **9**.

Verbindung	Messung mit 6 eq	Messung mit 3 eq	Messung mit 1 eq	Messung mit 0.5 eq
Trimer-TEG <b>55</b>	61	48	62	61
	55	41	85	55
	42	38	82	51
Tannin <b>9</b>	15	10	10	17
	13	10	10	16
	13	11	12	14

Disaggregationsansätze der Liganden mit A $\beta$ (1-42)

33  $\mu\text{M}$  A $\beta$ (1-42) und 10  $\mu\text{M}$  ThT wurden in 1 x PBS bei 37 °C für 24 Stunden im Thermomixer (*Eppendorf* AG, Hamburg) bei 600 rpm inkubiert. Erst nach der Inkubation wurde der zu testende Ligand in einer Konzentration von 198  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die disaggregierende Wirkung der Liganden wurde über einen Zeitraum von 120 Stunden verfolgt.

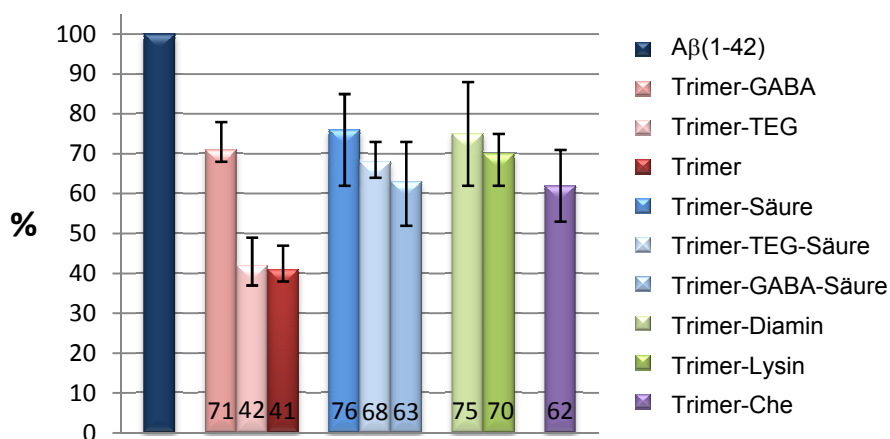
$c(\text{A}\beta(1-42)) = 33 \mu\text{M}$

$c(\text{Ligand}) = 198 \mu\text{M}$

$c(\text{ThT}) = 10 \mu\text{M}$

Das Gesamtvolumen betrug pro Ansatz 60  $\mu\text{L}$ , davon 4  $\mu\text{L}$  A $\beta$ (1-42) (495  $\mu\text{M}$ ), 6  $\mu\text{L}$  10 x PBS, 9.50  $\mu\text{L}$  ThT (62.75  $\mu\text{M}$ ) und 2.40  $\mu\text{L}$  Ligand (4.95 mM).

In **Abbildung 98** sind die Ergebnisse, angegeben in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100%), dargestellt.



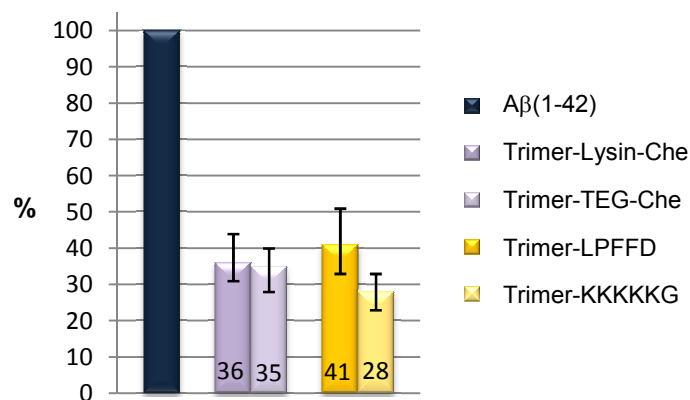
**Abb. 98:** Disaggregation der A $\beta$ (1-42)-Aggregate durch synthetisierte Liganden. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

In nachstehender **Tabelle 8** sind die Messwerte aus zwei Messungen mit je vier Ansätzen aufgeführt.

**Tabelle 8:** Messwerte der Disaggregationsansätze mit A $\beta$ (1-42) und dem jeweiligen Liganden.

Verbindung	1. Messung (in %)	2. Messung (in %)	Mittelwert aus beiden Messungen (in %)
Trimer-Lysin <b>45</b>	74	75	70
	74	63	
	62	66	
	72	70	
Trimer-Diamin <b>43</b>	86	67	75
	75	62	
	74	73	
	78	85	
Trimer-GABA <b>38</b>	68	69	71
	79	70	
	68	74	
	71	72	
Trimer-GABA-Säure <b>40</b>	71	52	63
	71	54	
	58	67	
	73	60	
Trimer-Säure <b>34</b>	77	80	76
	68	80	
	69	79	
	78	79	
Trimer <b>21</b>	46	41	41
	36	47	
	35	42	
	35	45	
Trimer-TEG <b>55</b>	47	47	42
	36	37	
	42	34	
	49	42	
Trimer-TEG-Säure <b>62</b>	69	73	68
	66	64	
	66	66	
	72	69	
Trimer-Che <b>47</b>	67	60	62
	67	53	
	57	63	
	64	66	

Bei den in **Abbildung 99** dargestellten Liganden wurden die Disaggregationsansätze für fünf Tage im Thermomixer vorinkubiert. Nach Zugabe des Liganden wurden die Ansätze weitere drei Tage inkubiert und erst dann vermessen.



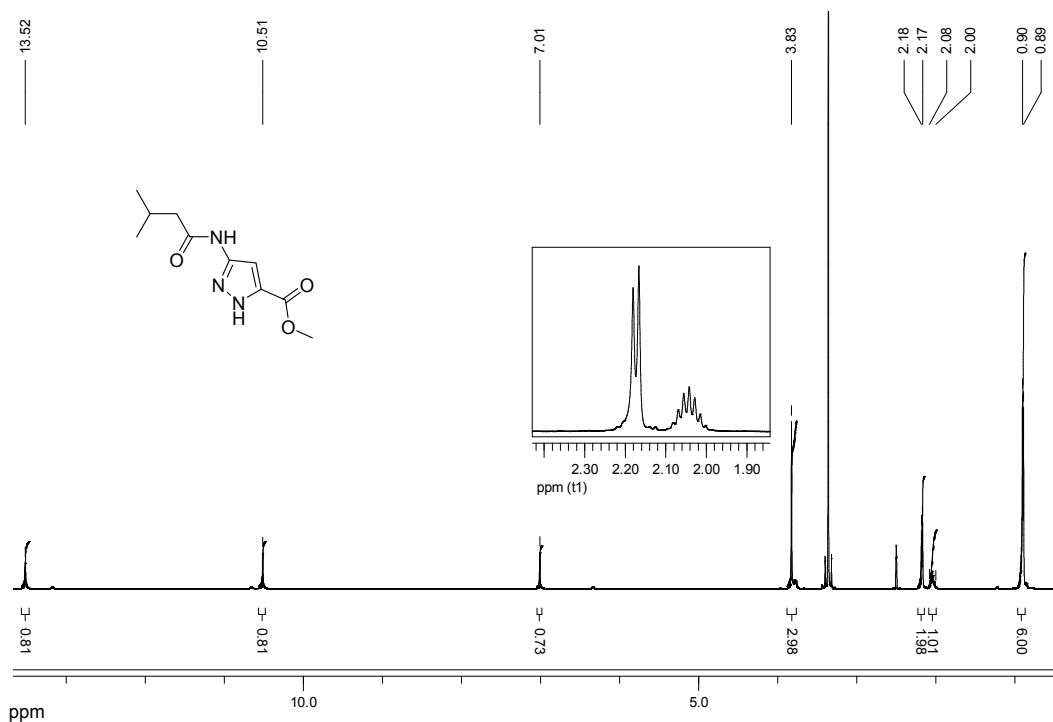
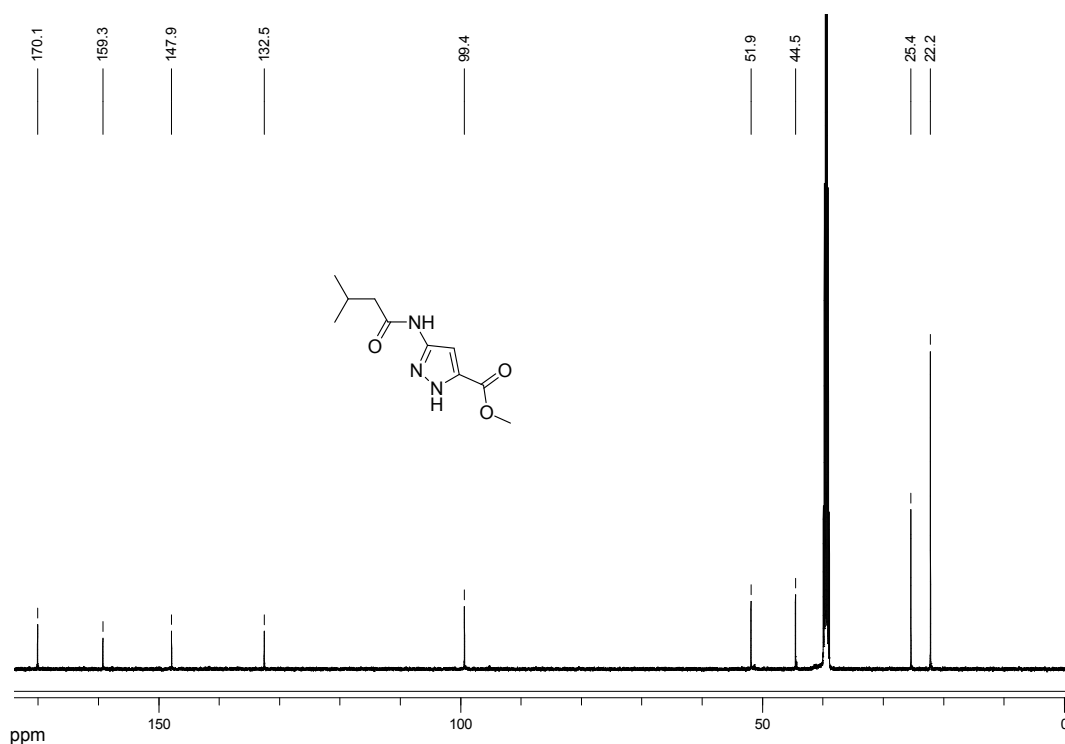
**Abb. 99:** Disaggregation der Aβ(1-42)-Aggregate durch synthetisierte Liganden. Die Resultate sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (100 %), angegeben.

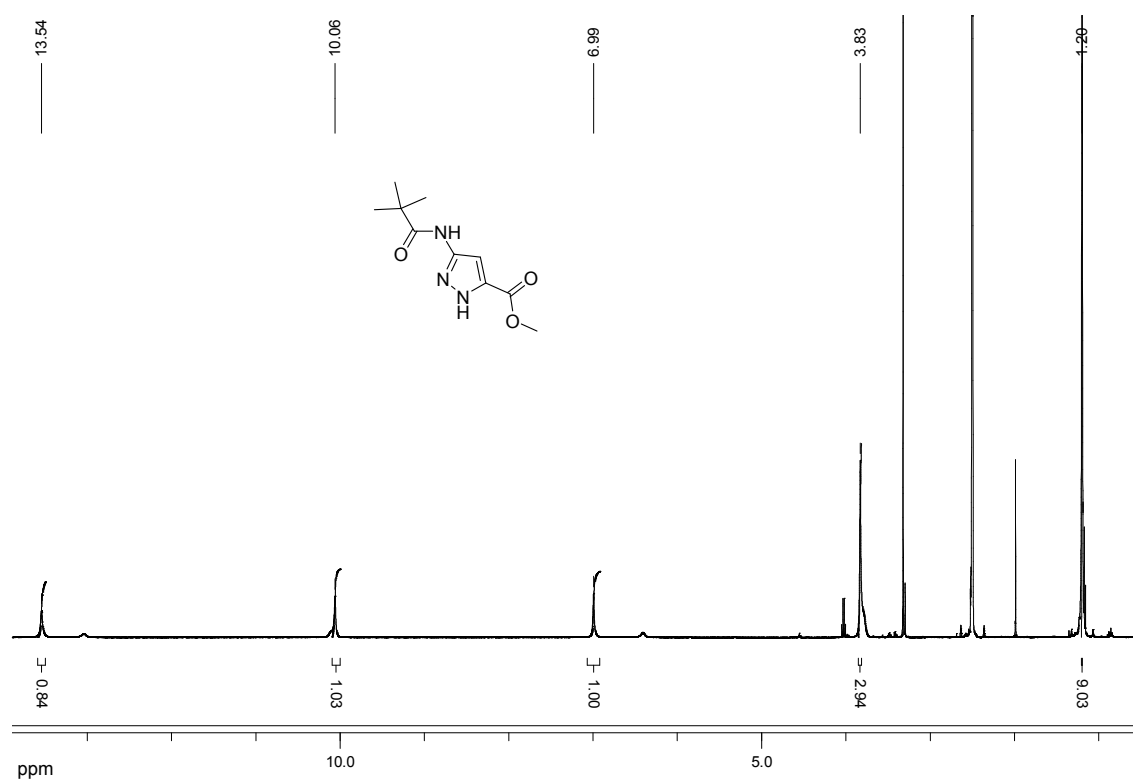
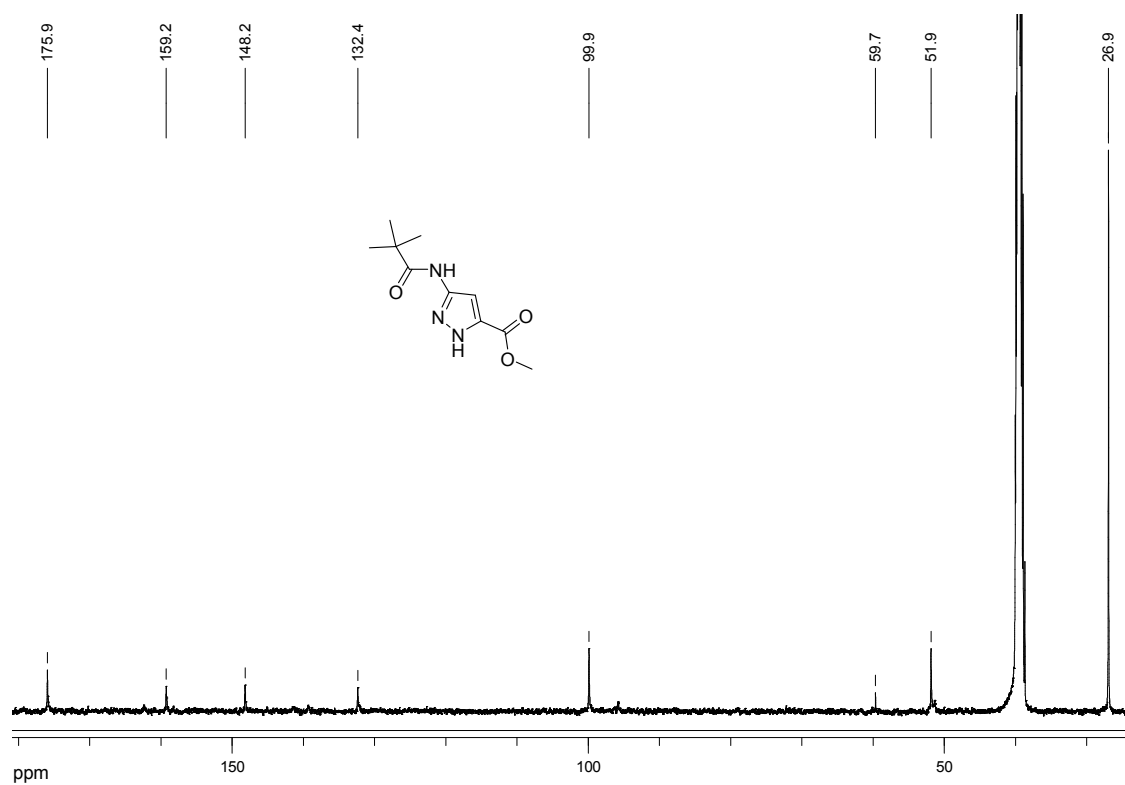
Es wurde eine Messung mit je vier Ansätzen durchgeführt. Die Messwerte sind in **Tabelle 9** gezeigt.

**Tabelle 9:** Messwerte der Disaggregationsansätze mit Aβ(1-42) und dem jeweiligen Liganden.

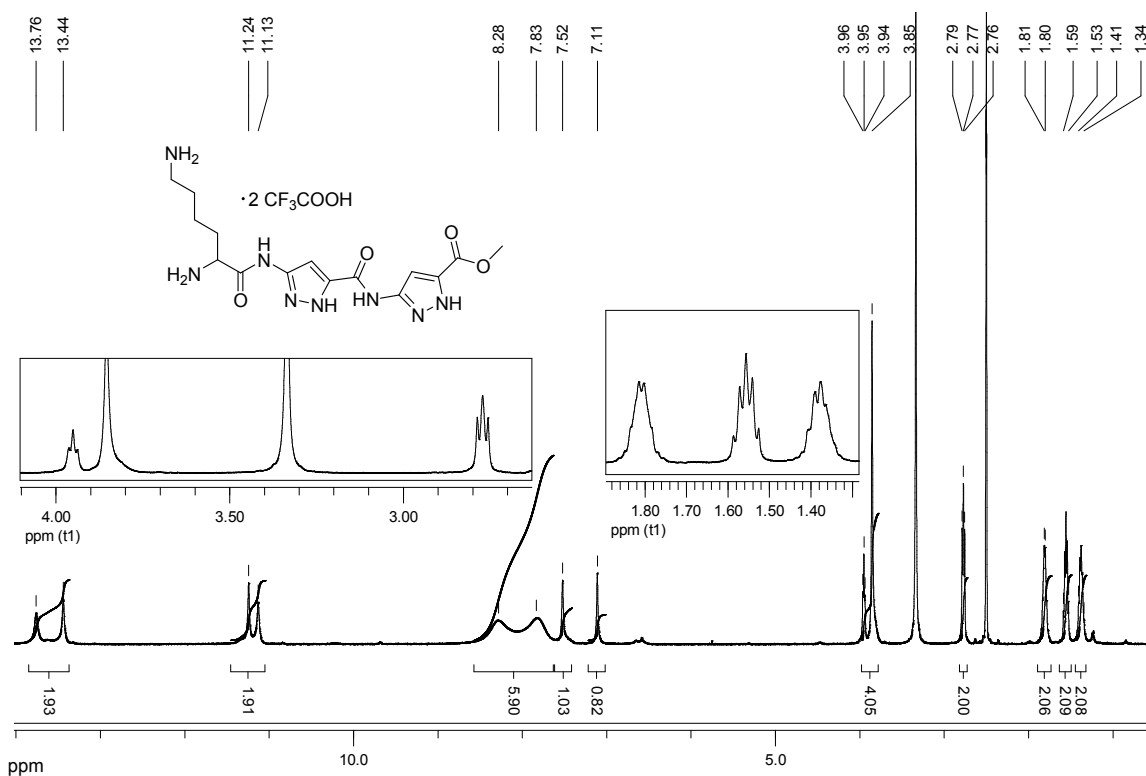
Verbindung	Messung (in %)	Mittelwert (in %)
Trimer-Lysin-Che <b>53</b>	42	41
	39	
	32	
	31	
Trimer-TEG-Che <b>58</b>	28	36
	34	
	37	
	40	
Trimer-LPFFD <b>60</b>	41	35
	39	
	52	
	33	
Trimer-KKKKKKG <b>59</b>	29	28
	33	
	27	
	23	

## 6 Anhang

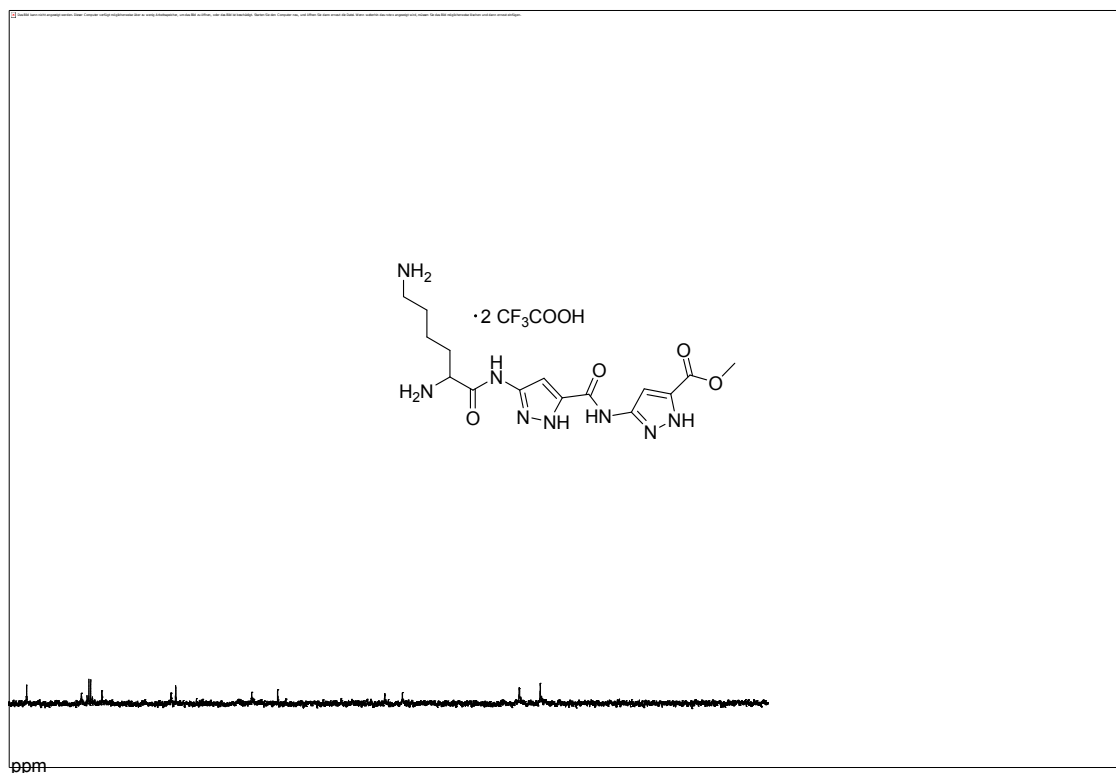
6.1 NMR-Spektren von 3-(3-Methylbutanamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **66**Abb. 100: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **66** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).Abb. 101: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **66** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

6.2 NMR-Spektren von 3-Pivalamido-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **68**Abb. 102:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **68** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).Abb. 103:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **68** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

### 6.3 NMR-Spektren von 3-(3-(2,6-Diaminohexanamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat **70**



**Abb. 104:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **70** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 105:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **70** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.4 NMR-Spektren von 3-(3-Palmitamido-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 72

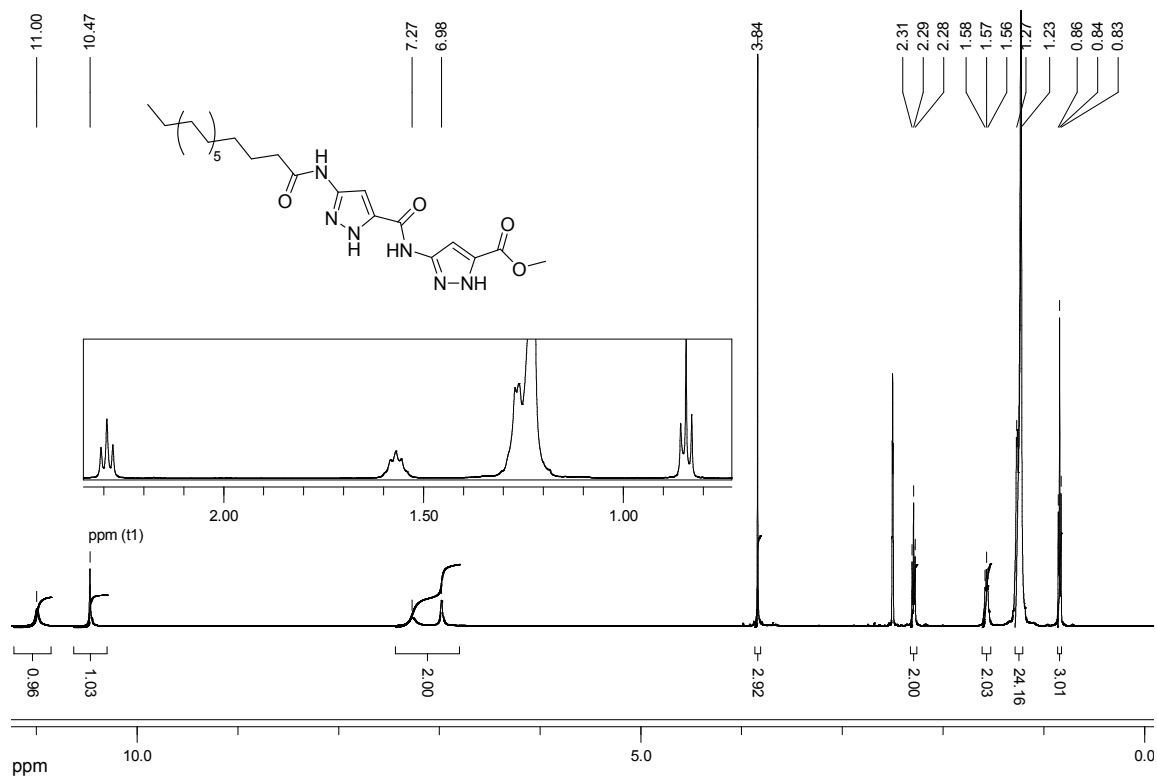


Abb. 106: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 72 (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

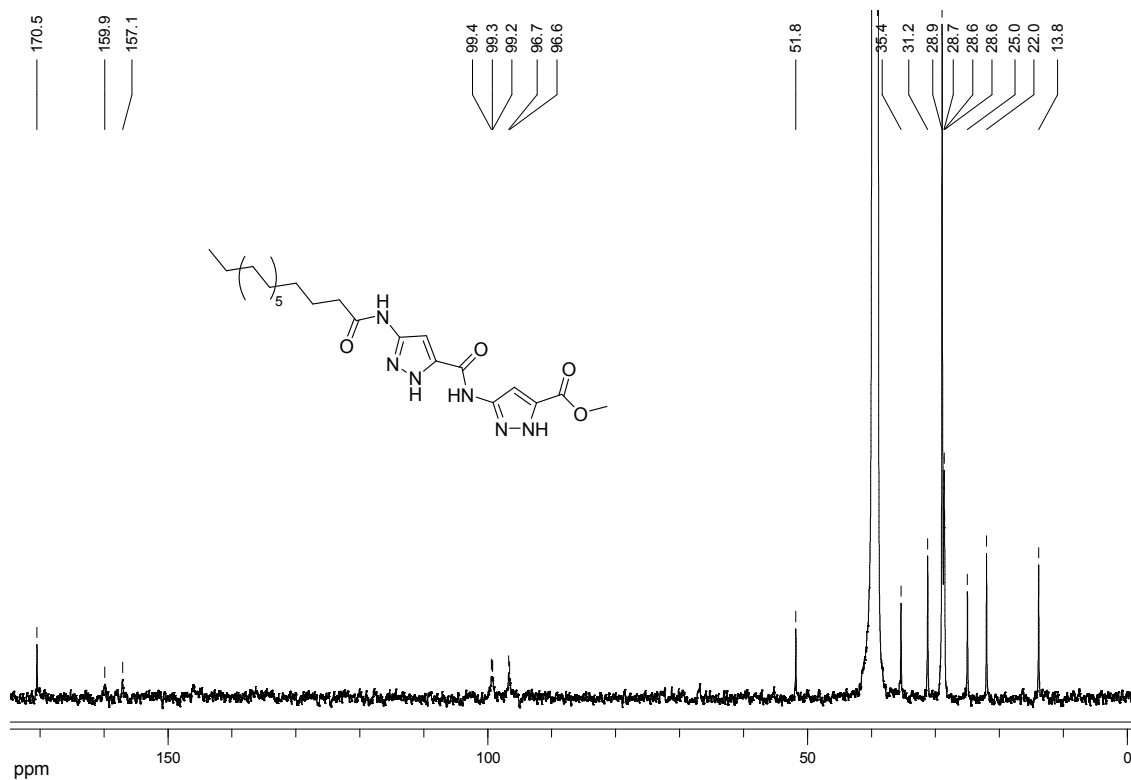


Abb. 107: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von 72 (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).



### 6.5 NMR-Spektren von *N*<sup>ε</sup>-Amino-2-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-lysiny-carbonsäuremethylester-trifluoracetat **74**

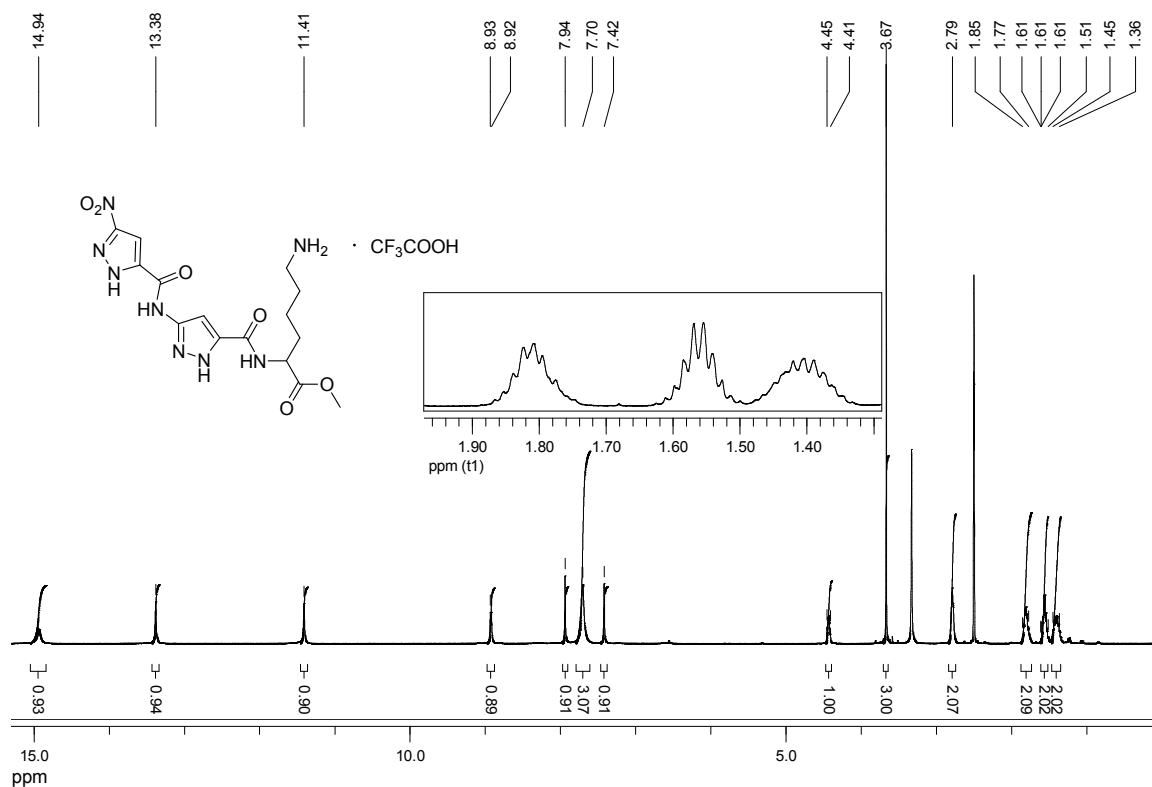


Abb. 108: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **74** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

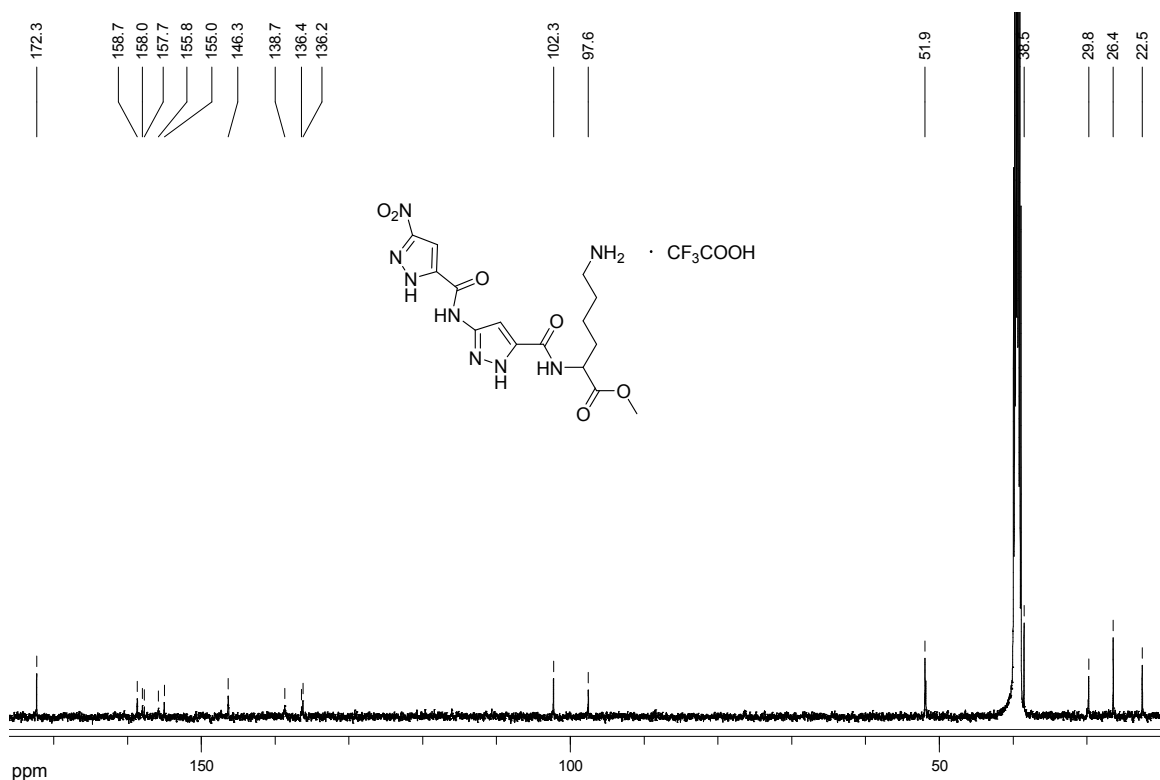


Abb. 109: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **74** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

# 6.6 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 29

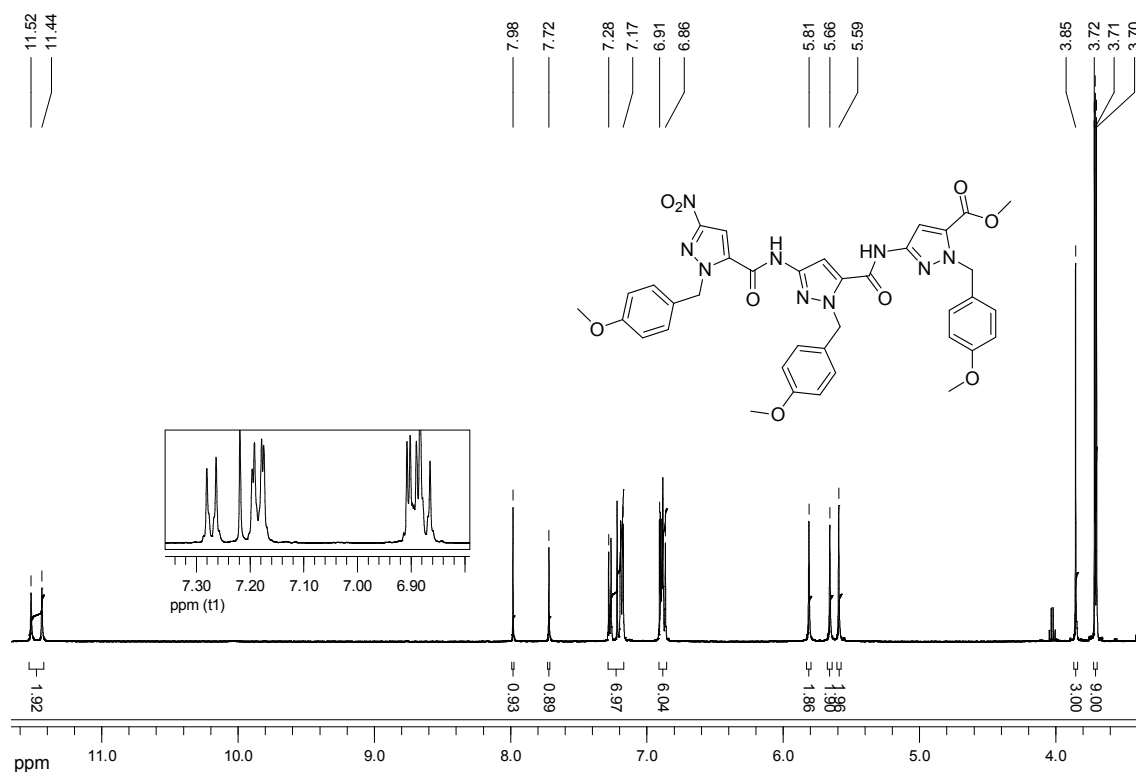


Abb. 110: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **29** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

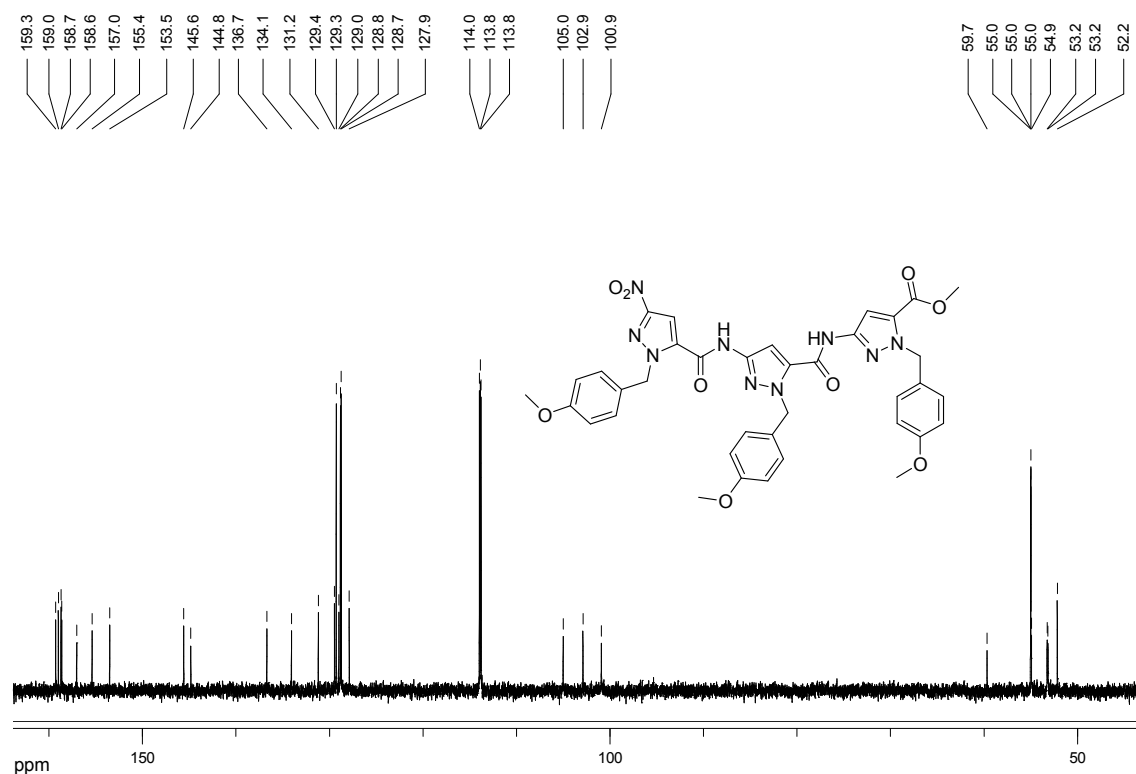


Abb. 111: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **29** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.7 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **21**

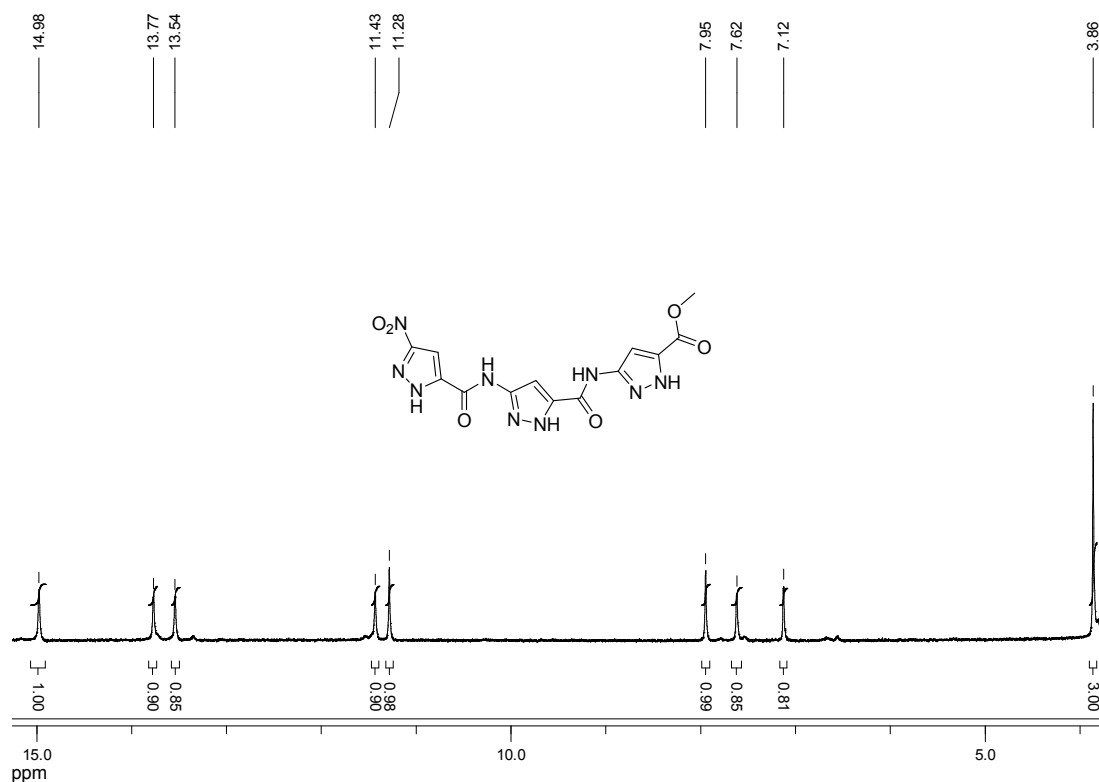


Abb. 112: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **21** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

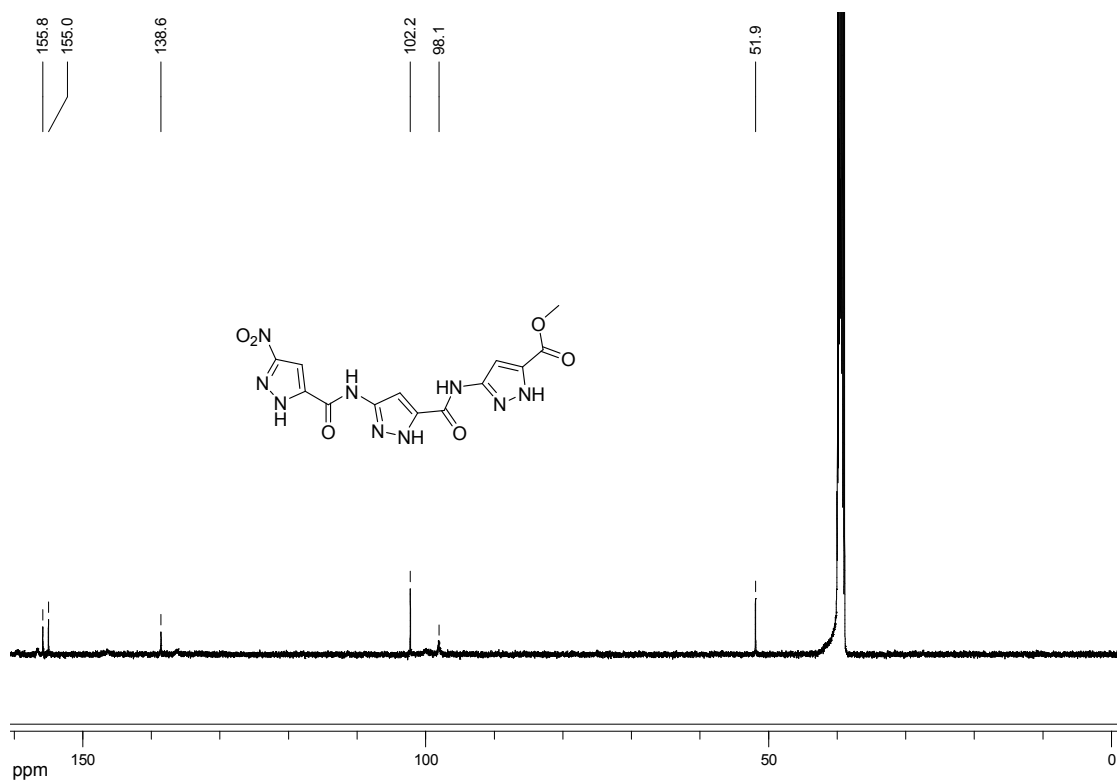


Abb. 113: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **21** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

# 6.8 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **33**

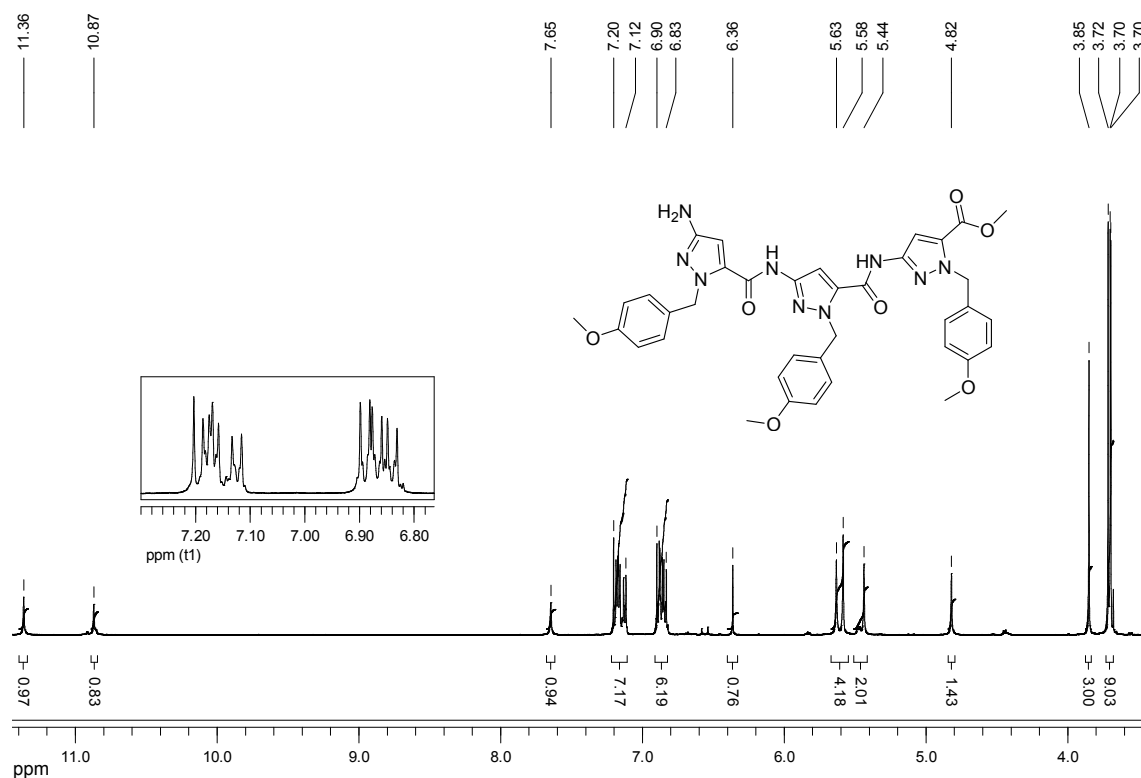


Abb. 114: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **33** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

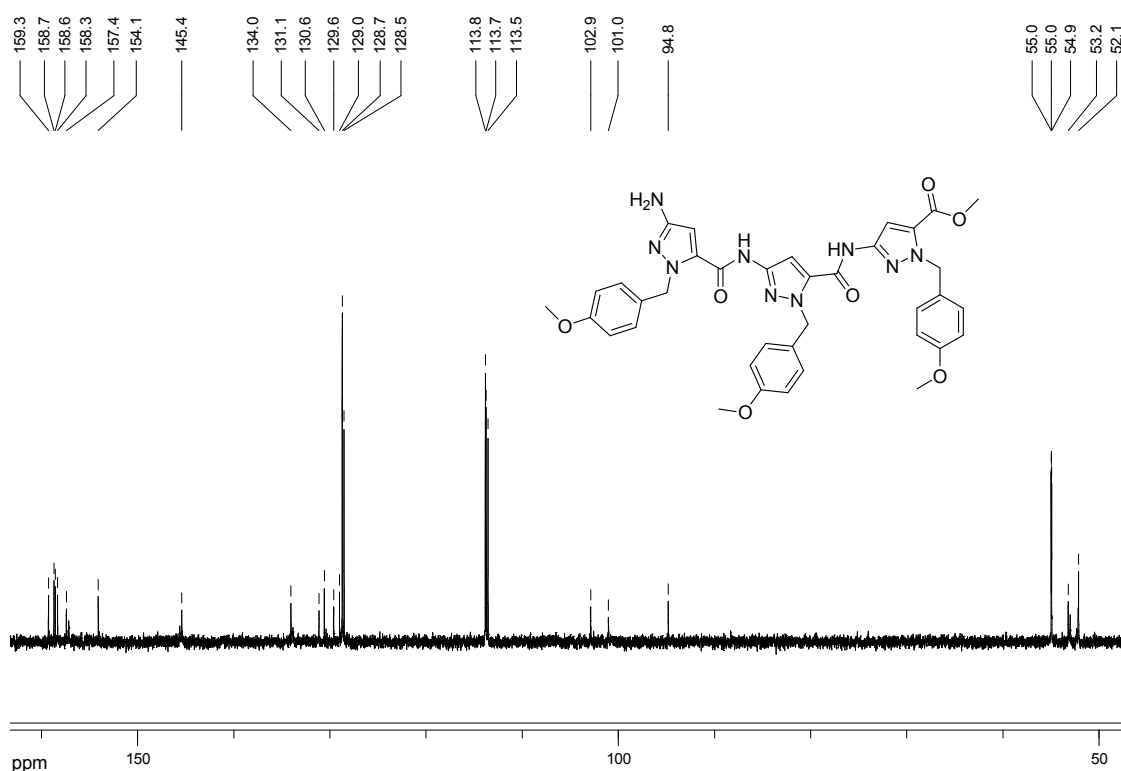


Abb. 115: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **33** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.9 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Amino-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester-trifluoracetat **35**

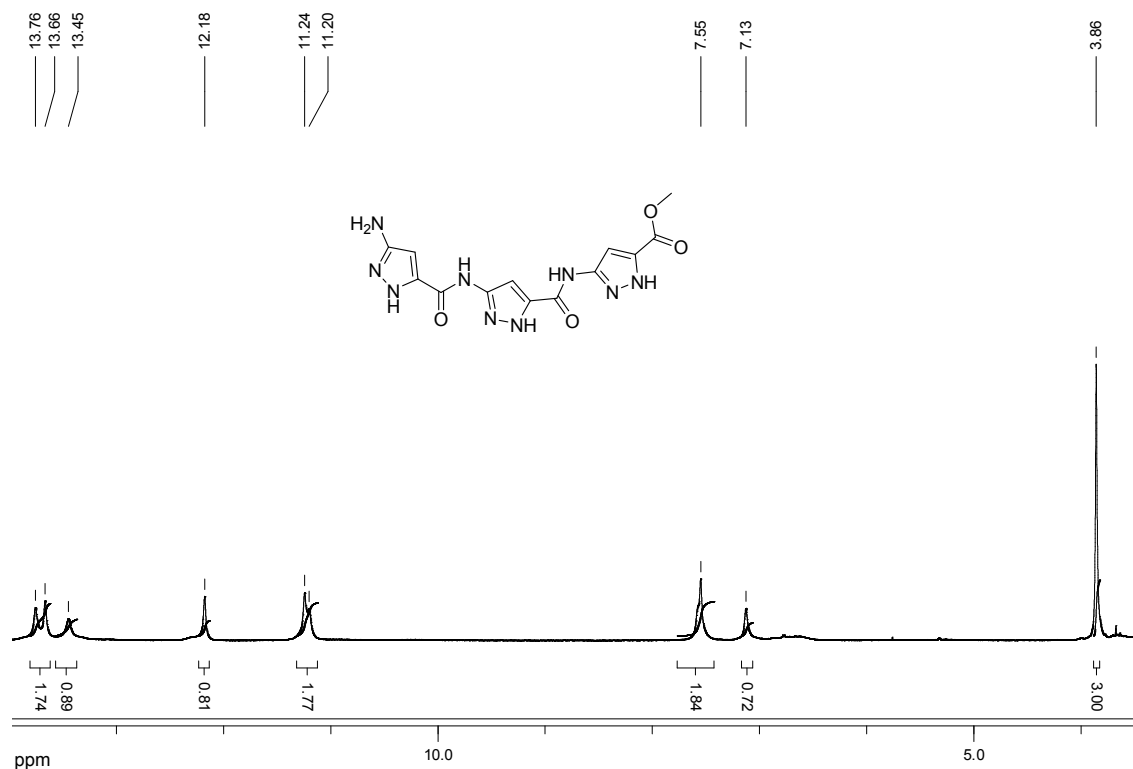


Abb. 116: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **35** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

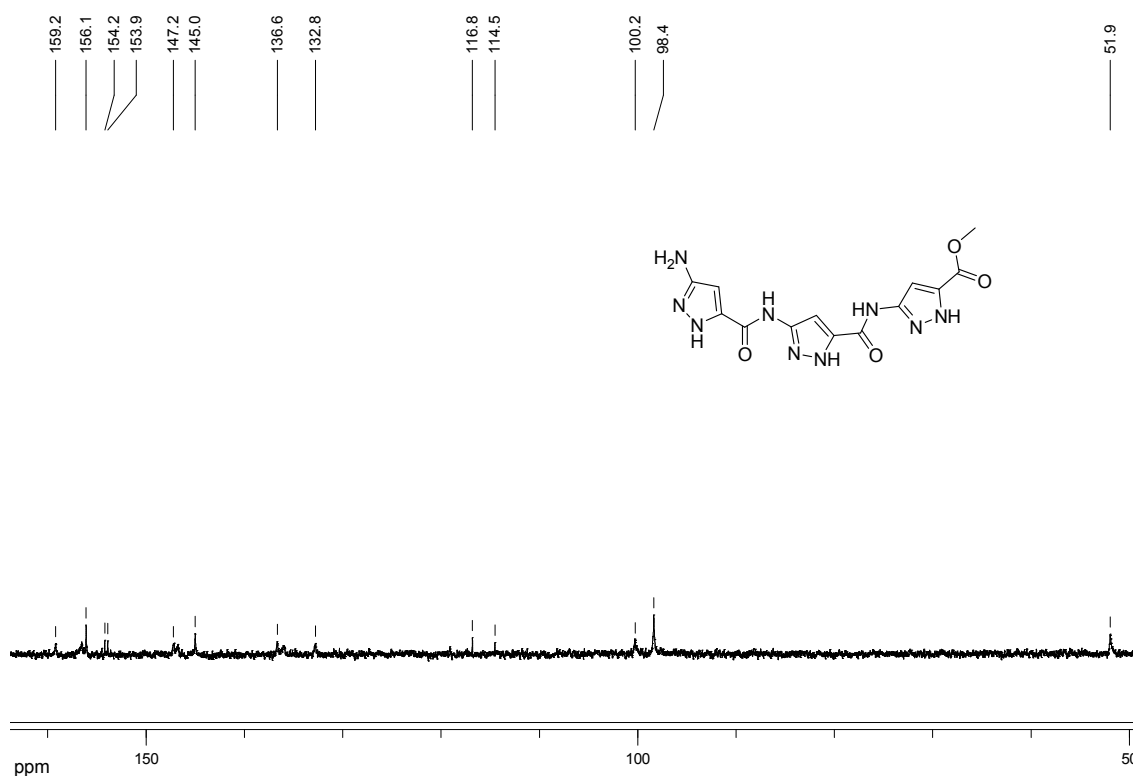


Abb. 117: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **35** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

# 6.10 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure 34

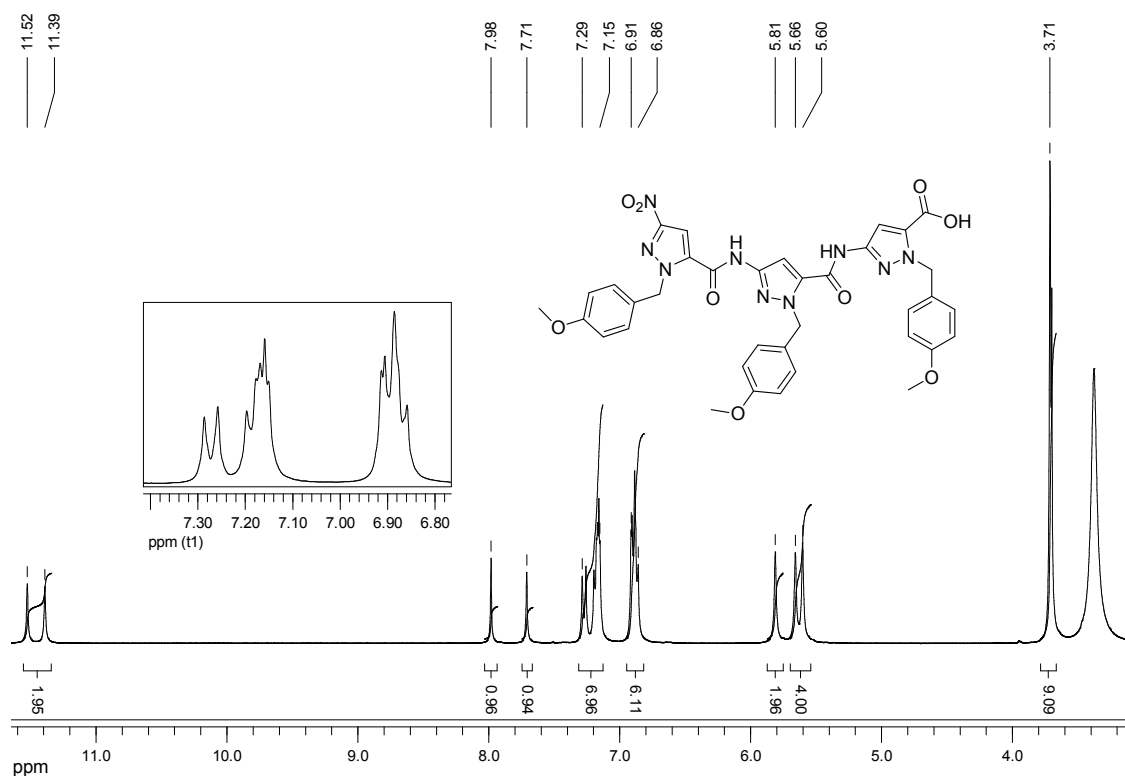


Abb. 118: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **34** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

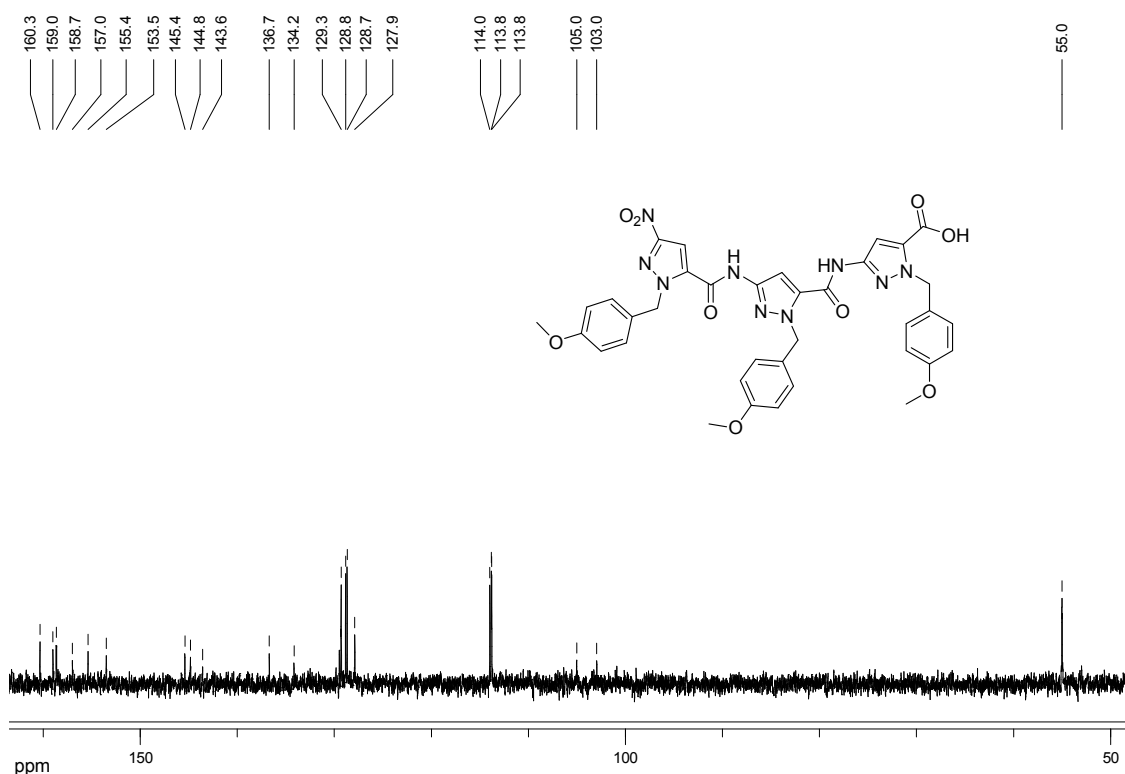


Abb. 119: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **34** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.11 NMR-Spektren von 3-(3-(3-Nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure **36**

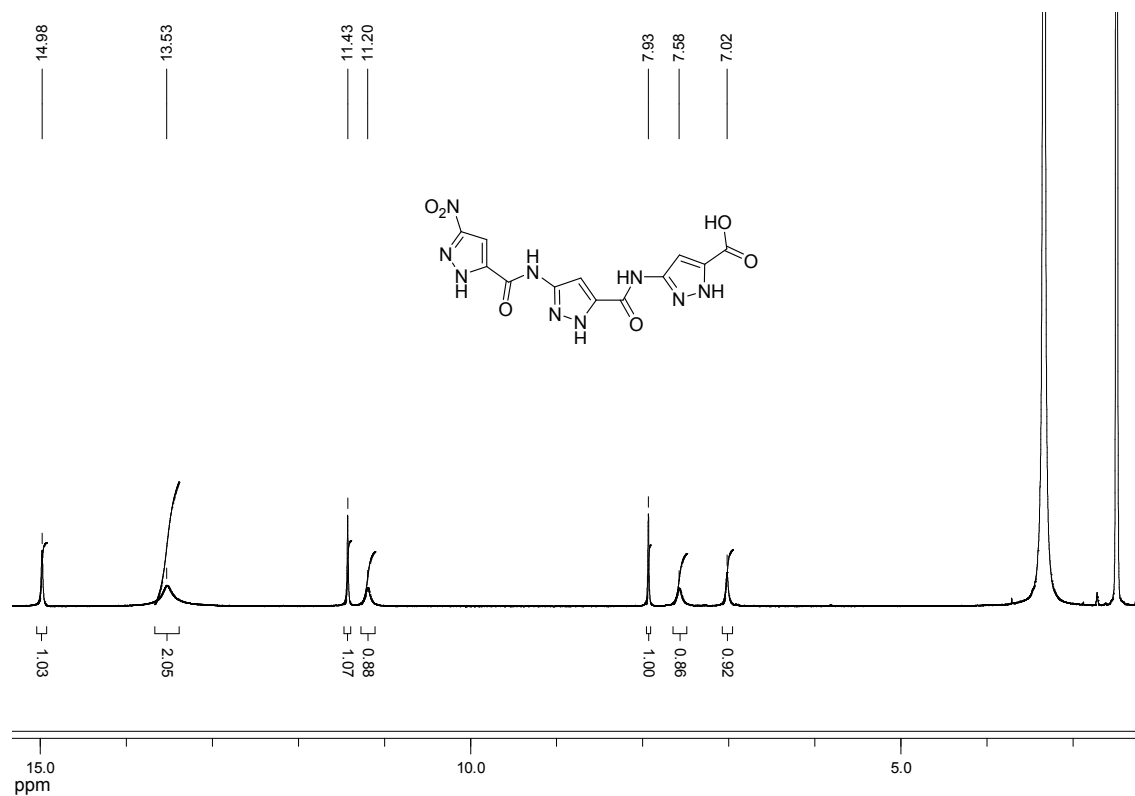


Abb. 120: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **36** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

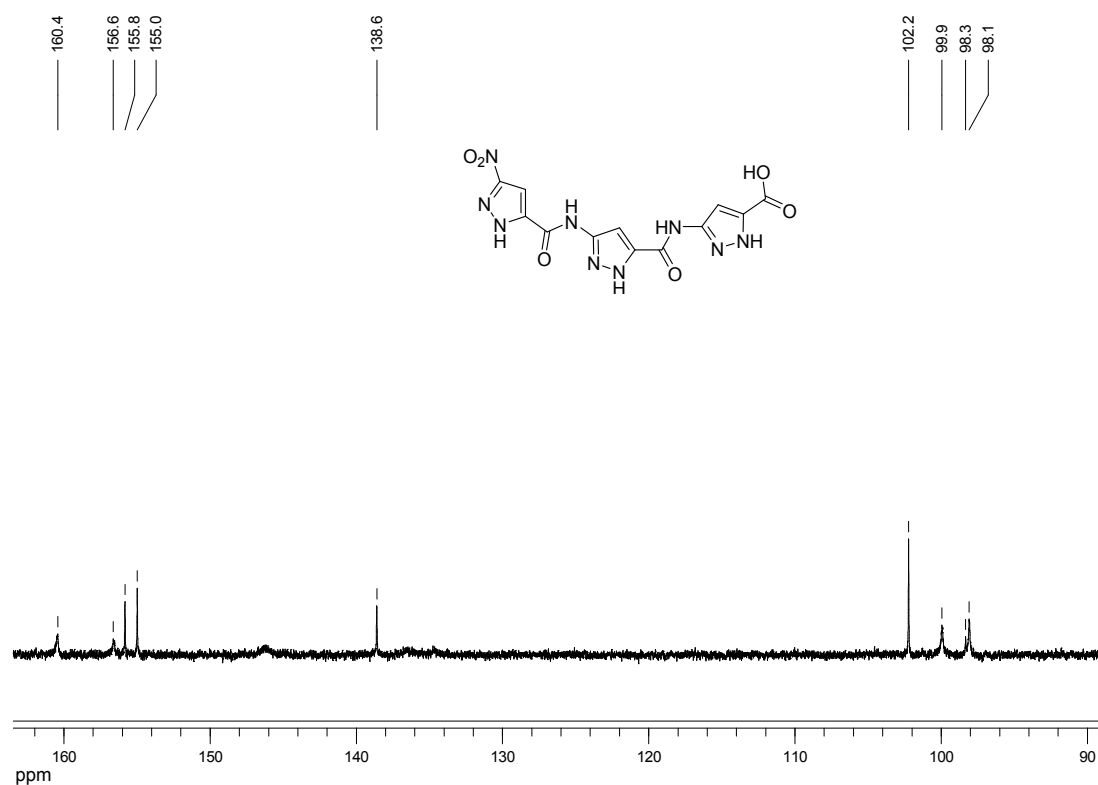


Abb. 121: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **36** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

### 6.12 NMR-Spektren von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-6-(*tert*-butoxycarbonyl)-lysiny-carbonsäuremethylester **44**

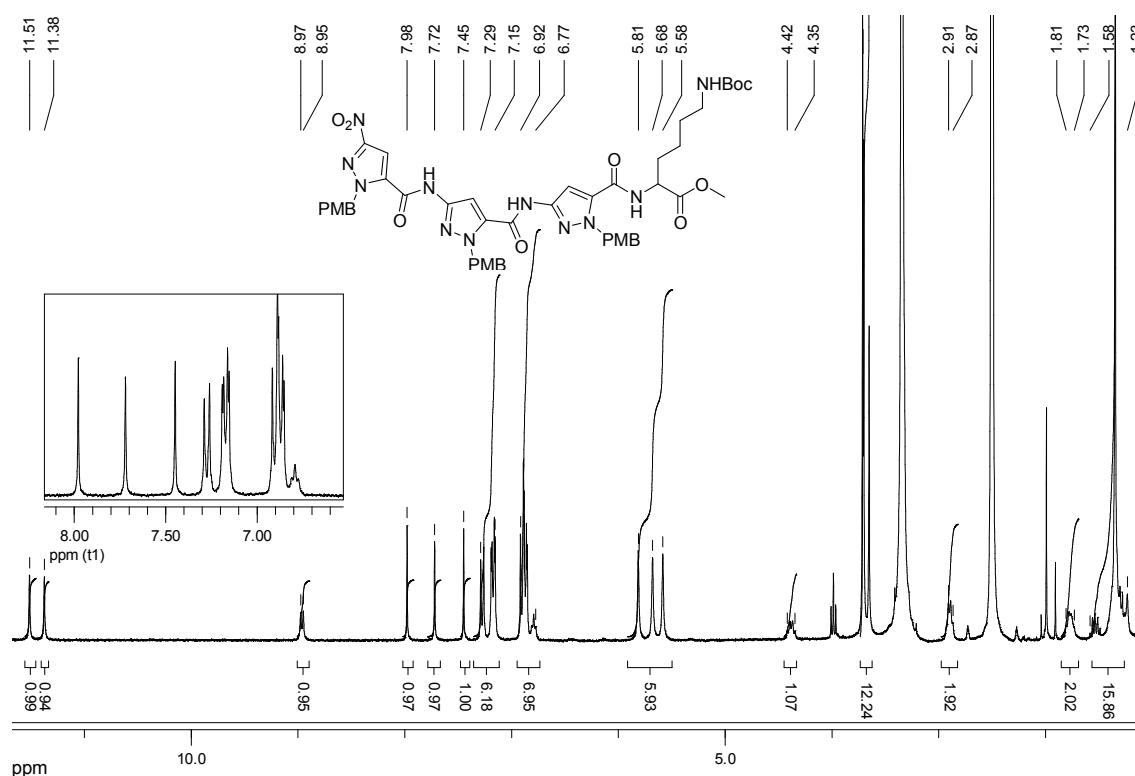


Abb. 122: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **44** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

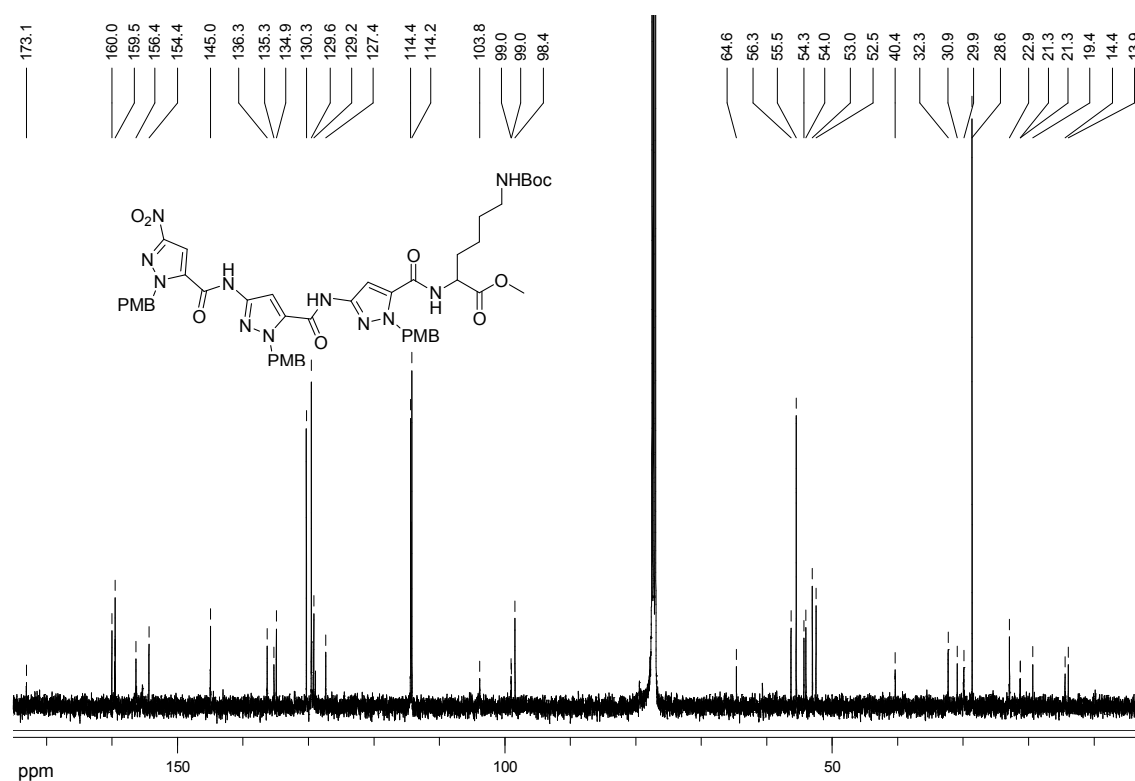


Abb. 123: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **44** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).



### 6.13 NMR-Spektren von 6-Amino-2-(3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-lysiny-carbonsäuremethylester **45**

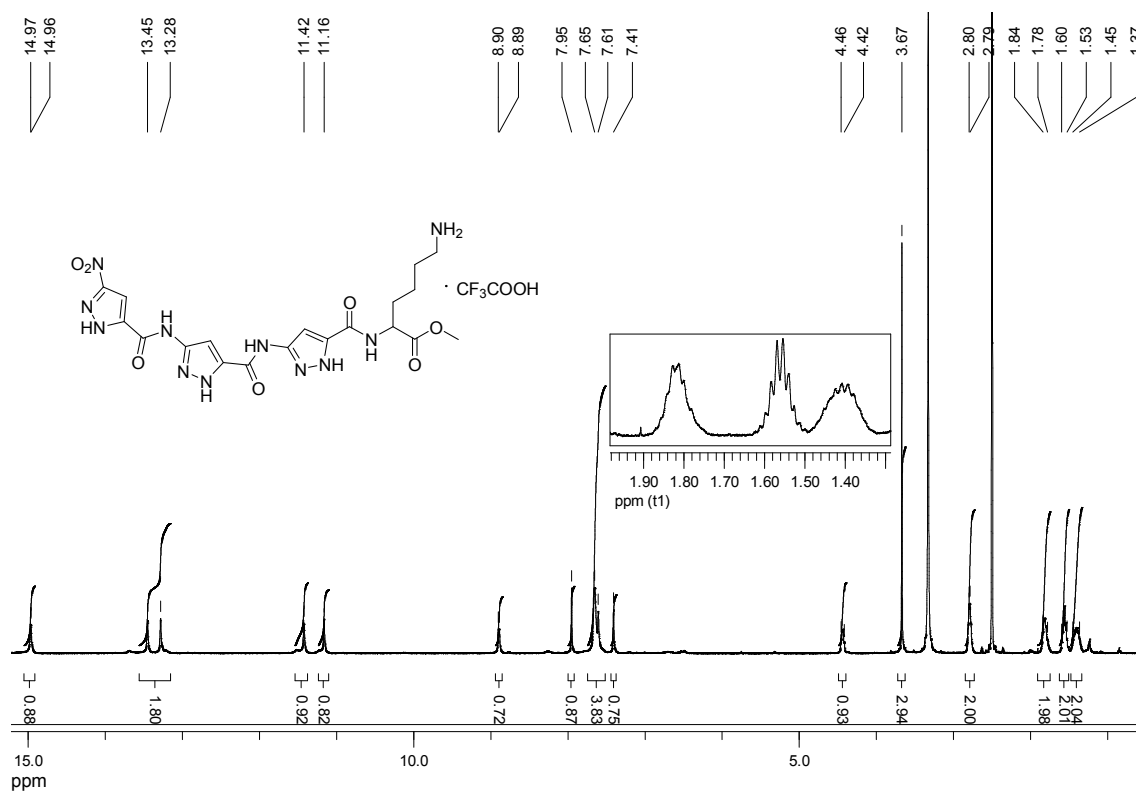


Abb. 124:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **45** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

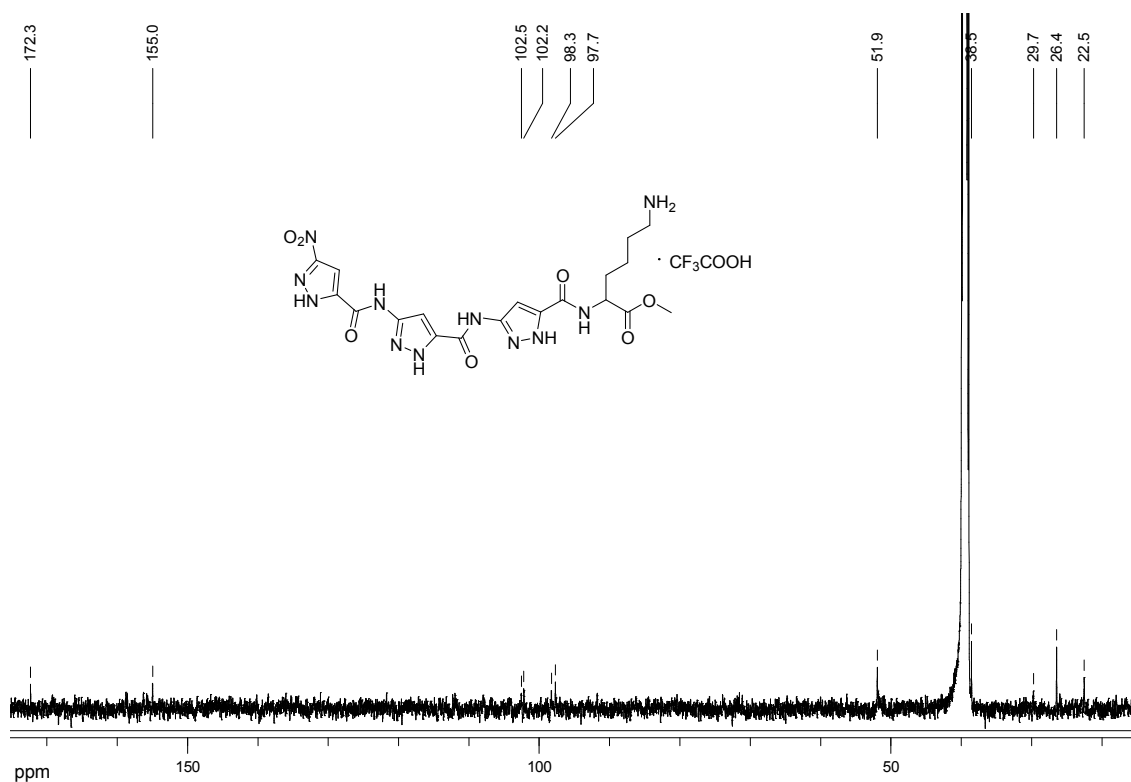


Abb. 125:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **45** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

# 6.14 NMR-Spektren von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido-6-(tert-butoxycarbonyl)-lysiny-carbonsäure 51

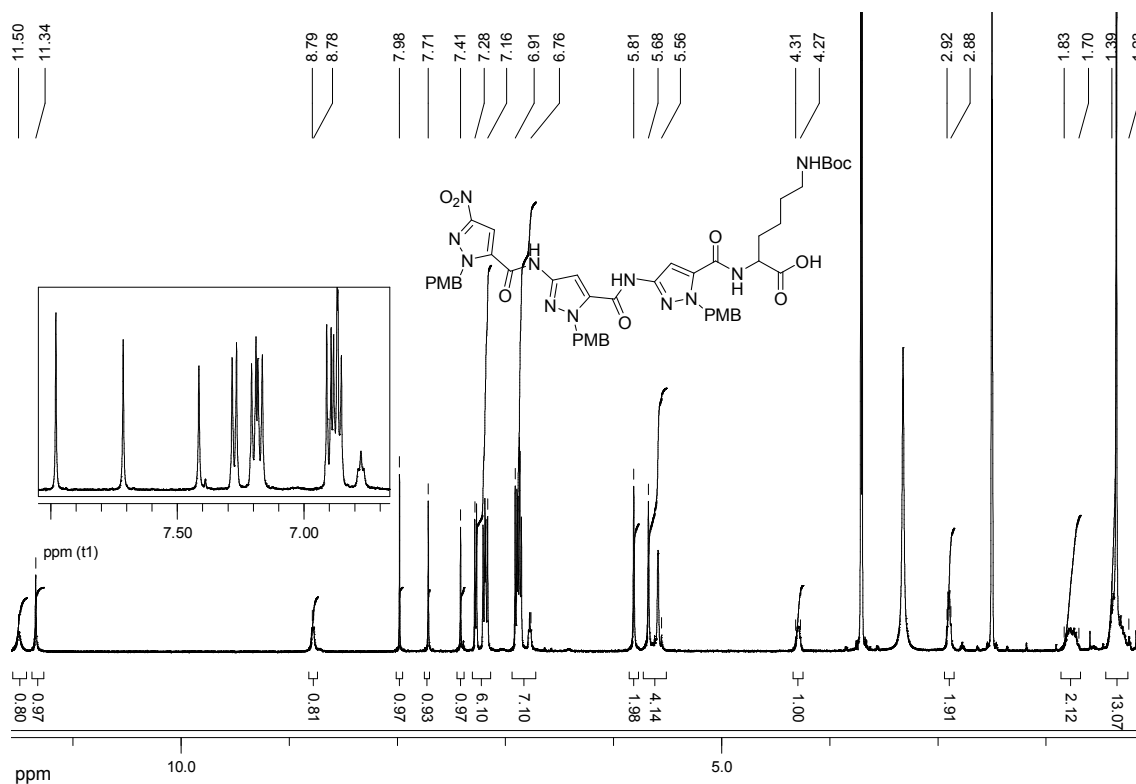


Abb. 126: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **51** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

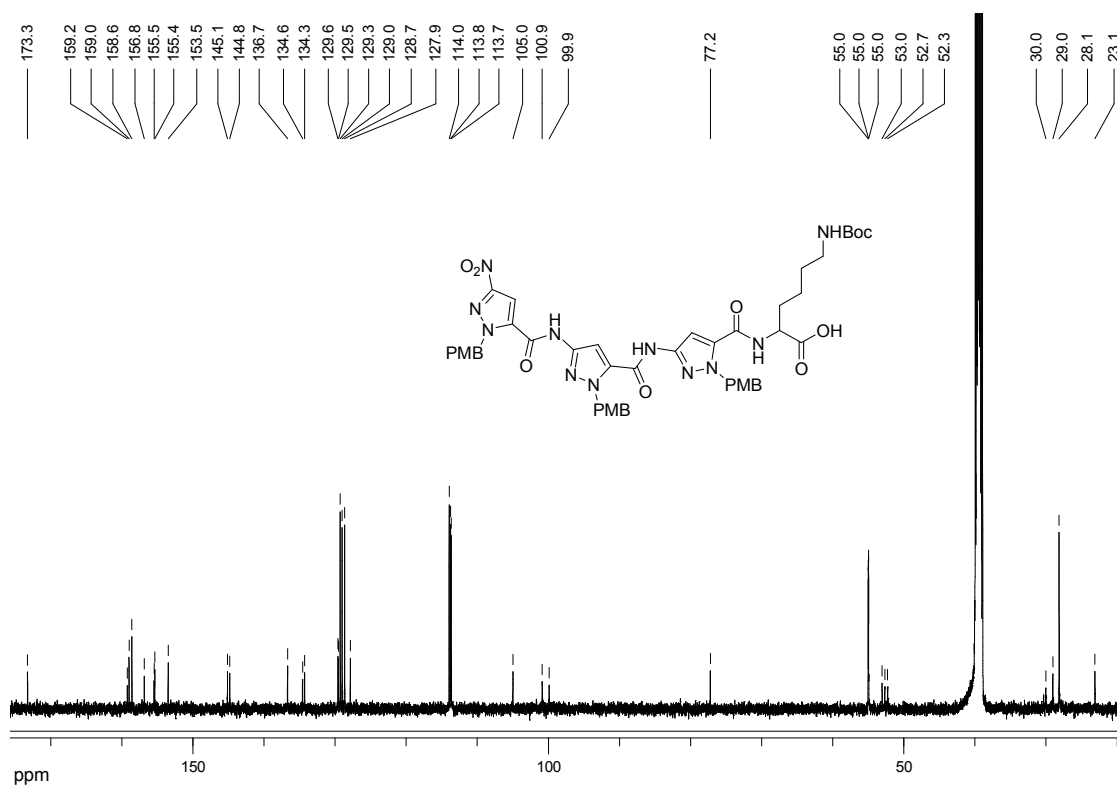
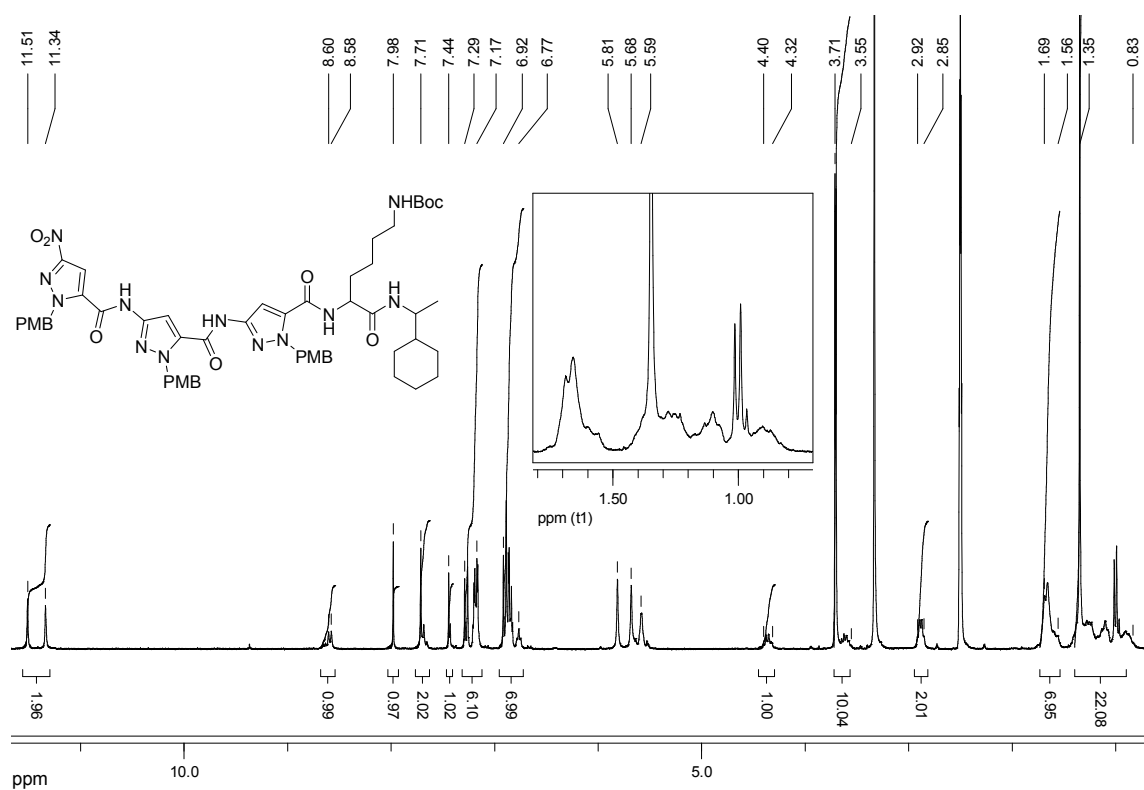
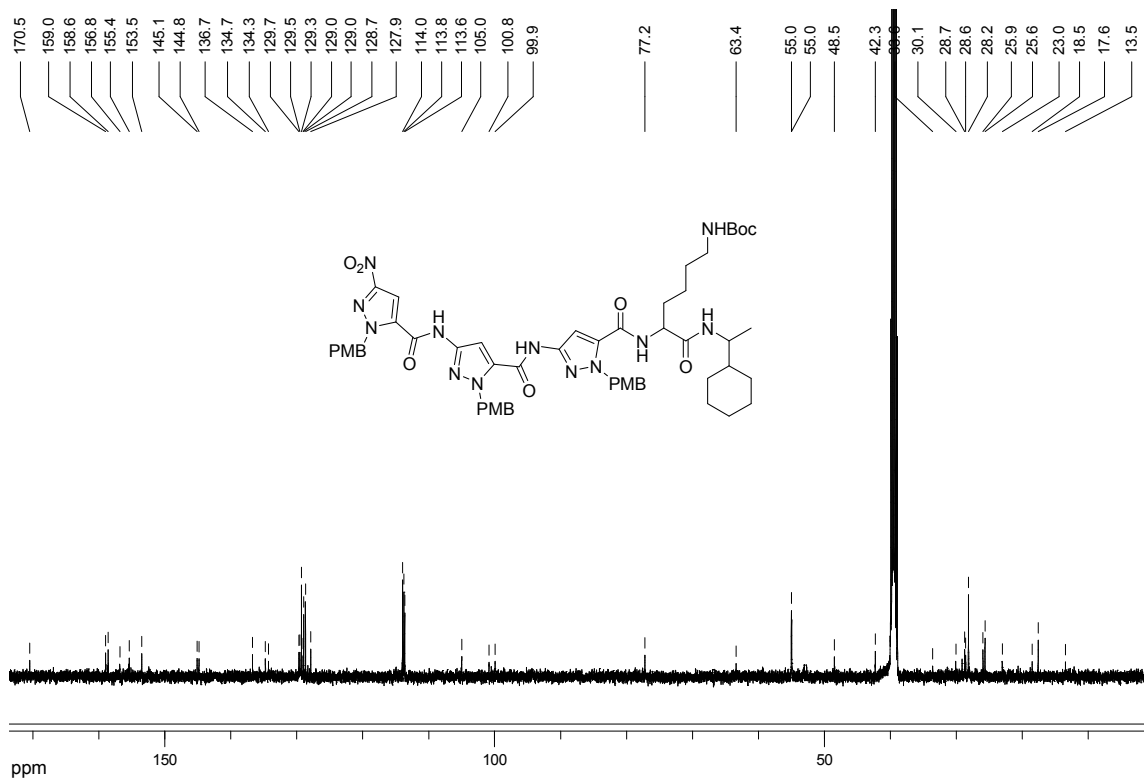


Abb. 127: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **51** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

### 6.15 NMR-Spektren von 6-(1-Cyclohexylethylamino)-5-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-6-oxo-hexylcarbammat 52

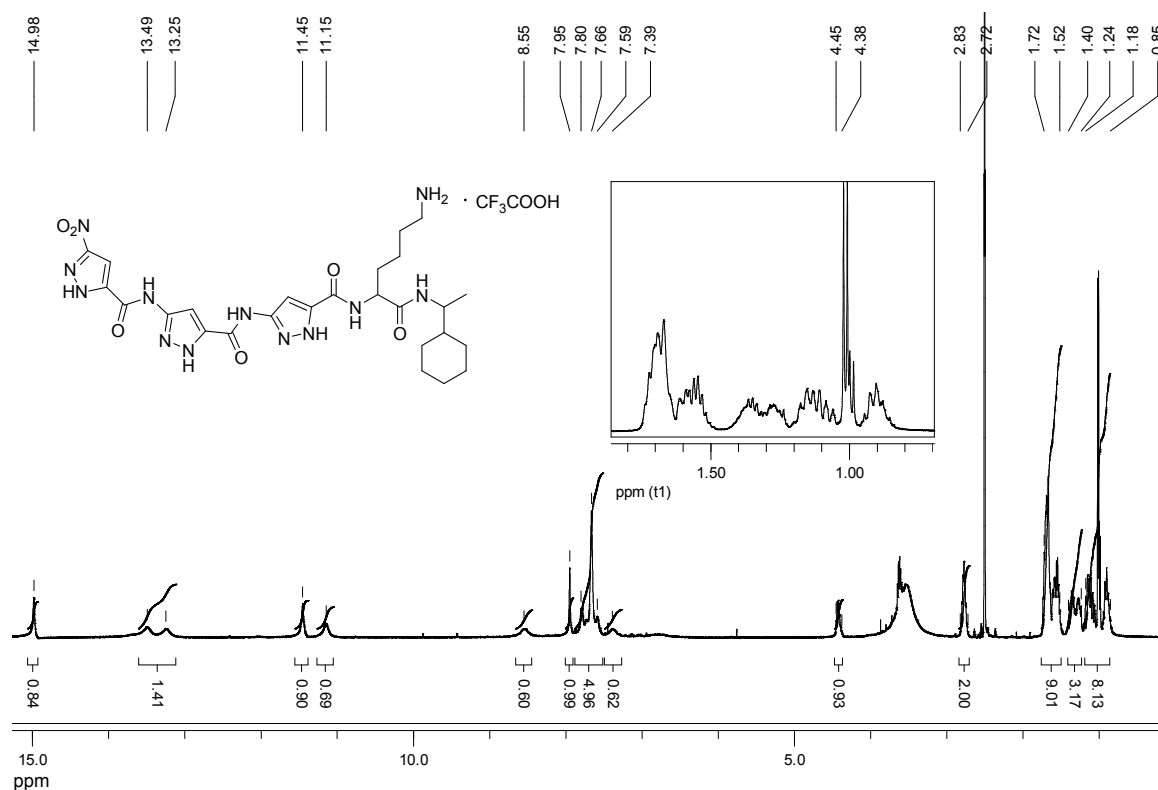


**Abb. 128:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **52** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

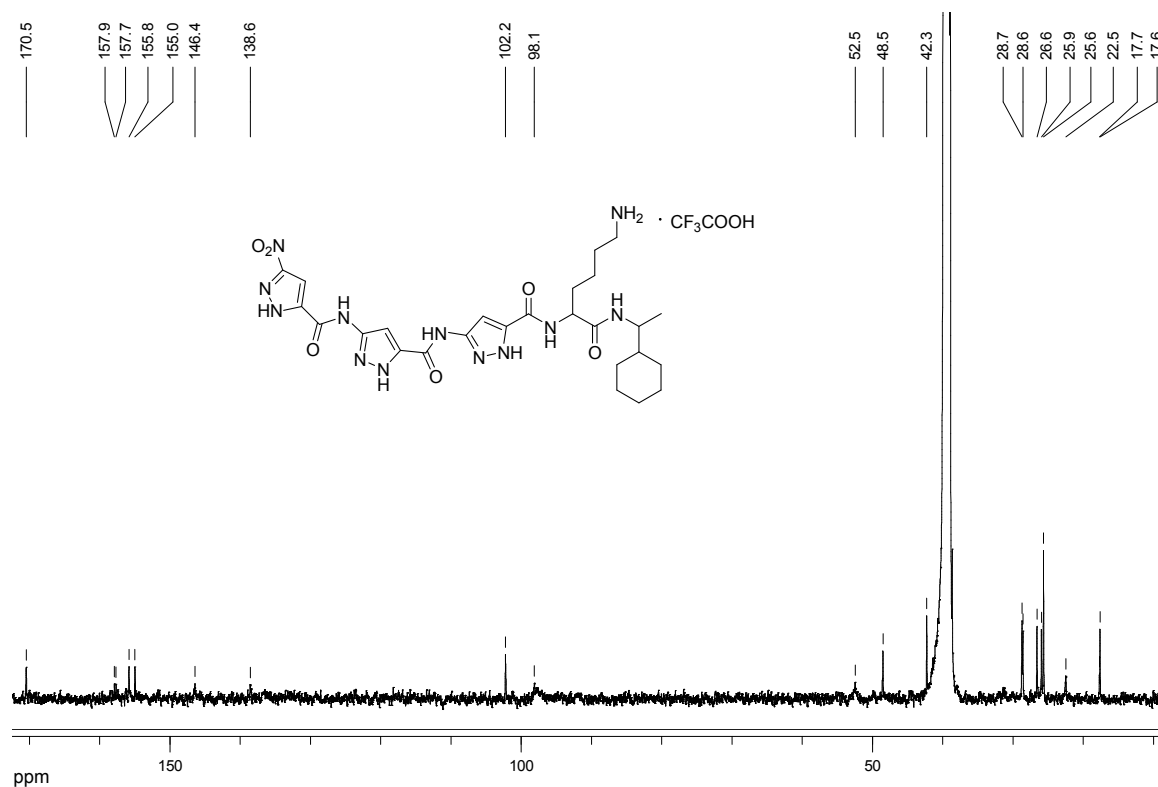


**Abb. 129:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **52** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

**6.16 NMR-Spektren von *N*-(6-Amino-1-(1-cyclohexylethylamino)-1-oxohexan-2-yl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid-trifluoracetat **53****

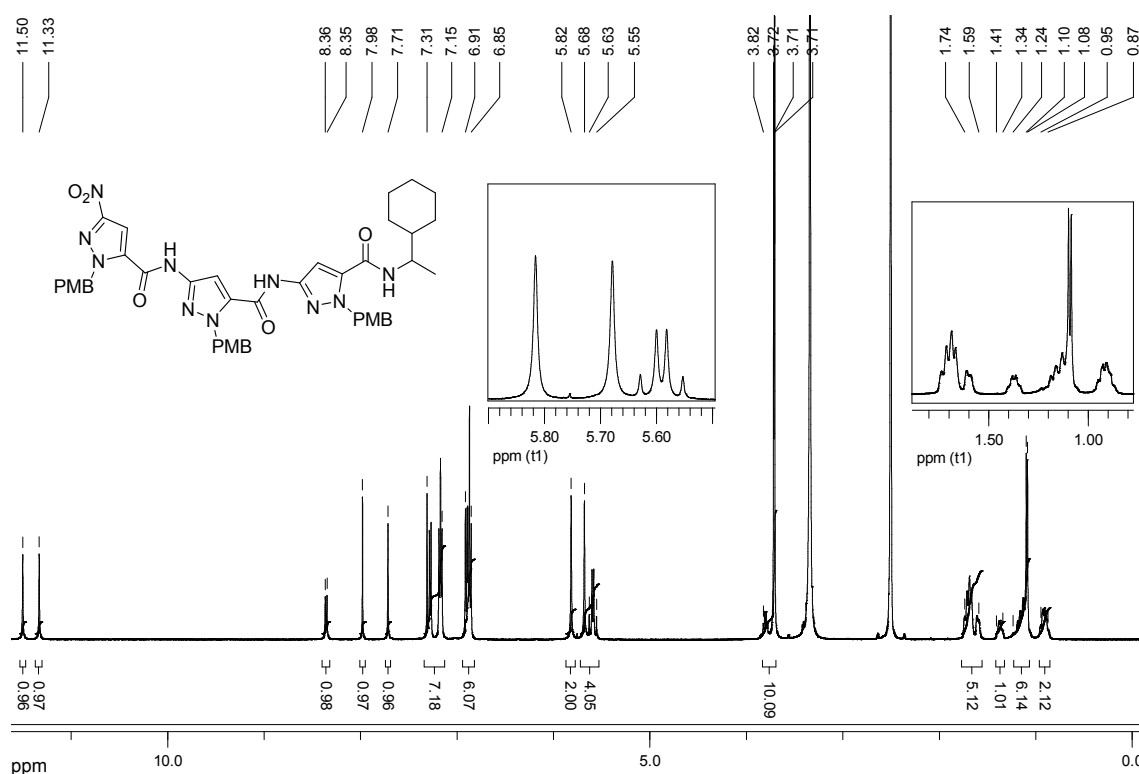


**Abb. 130:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **53** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

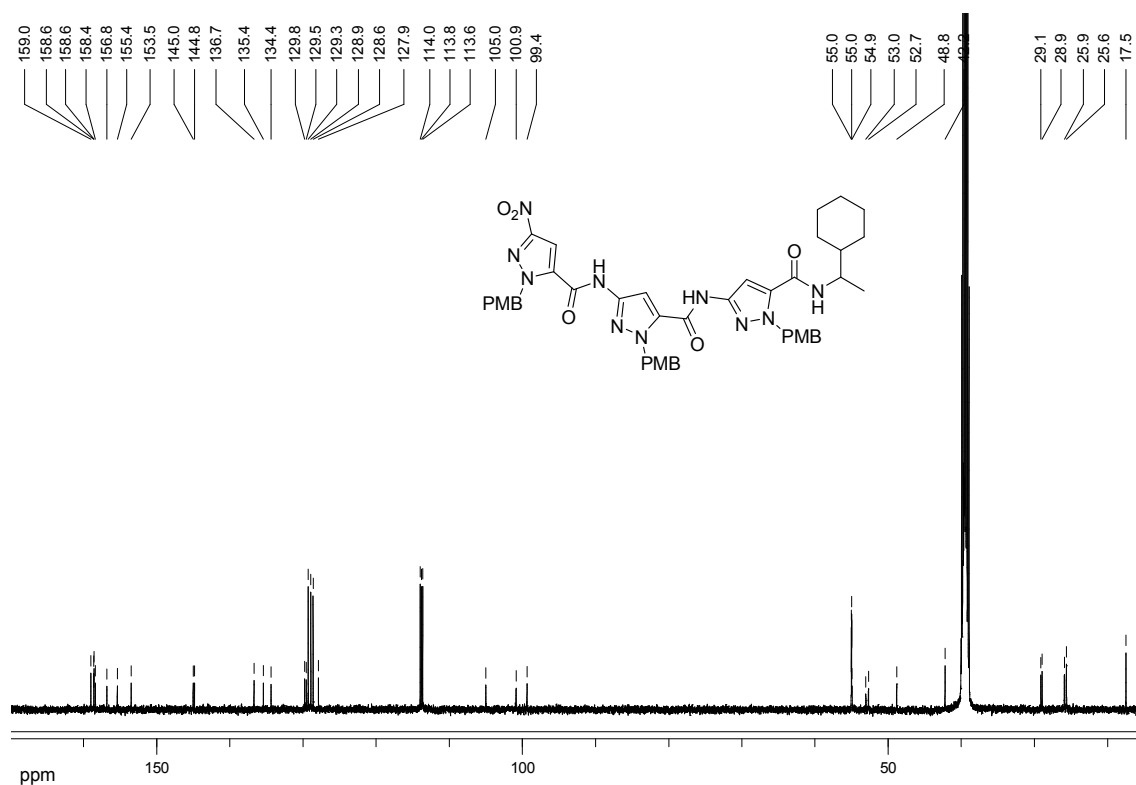


**Abb. 131:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **53** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

**6.17 NMR-Spektren von *N*-(1-Cyclohexylethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid 46**



**Abb. 132:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **46** (DMSO- $d_6$ , 298 K, 500 MHz).



**Abb. 133:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **46** (DMSO- $d_6$ , 298 K, 125 MHz).

# 6.18 NMR-Spektren von *N*-(1-Cyclohexylethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **47**

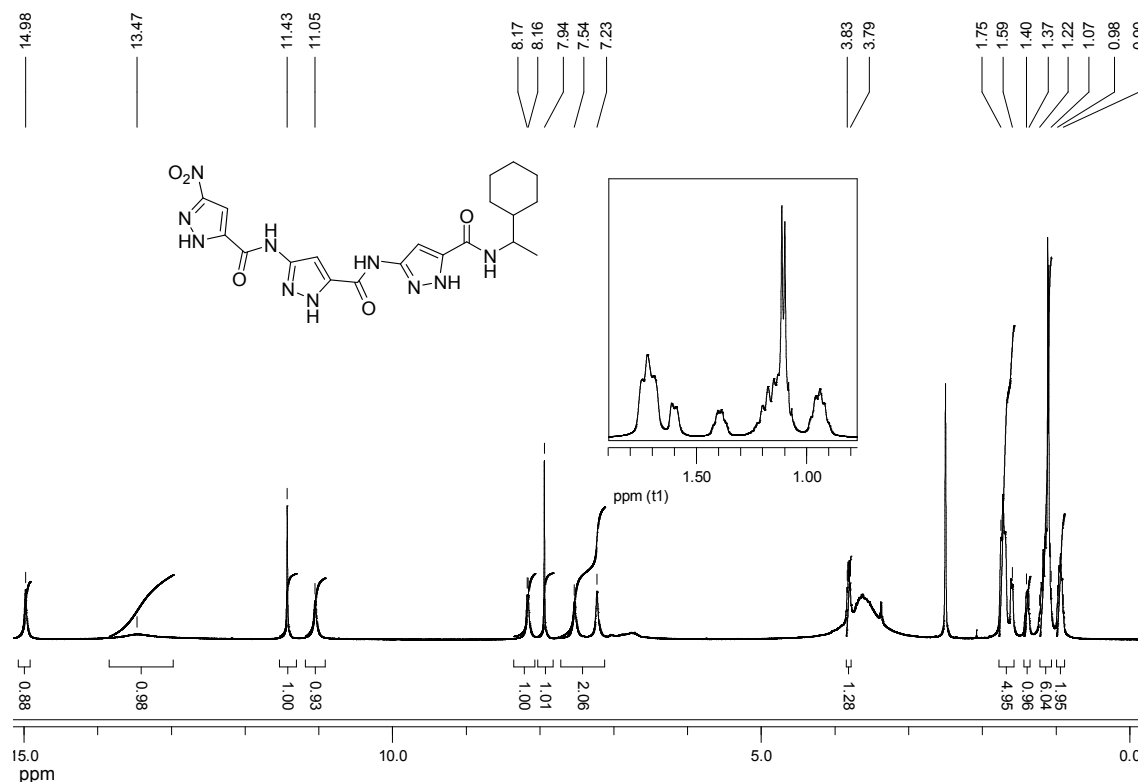


Abb. 134:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **47** (DMSO- $d_6$ , 298 K, 500 MHz).

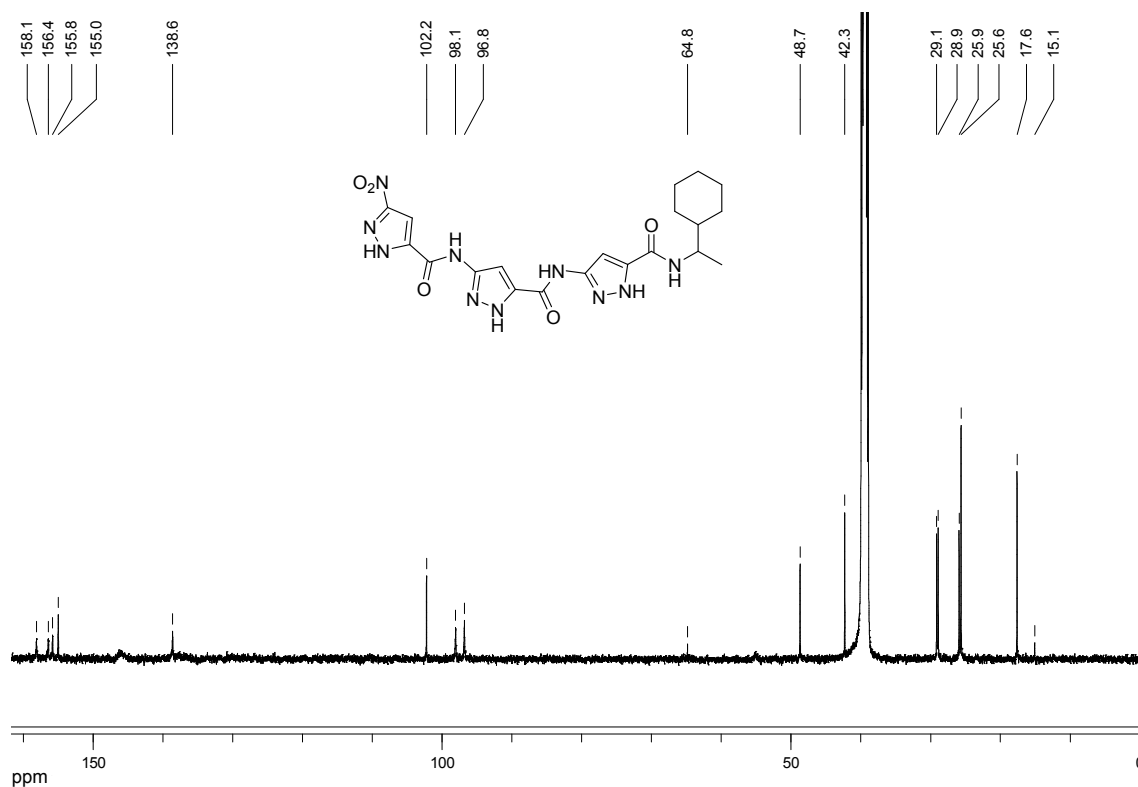
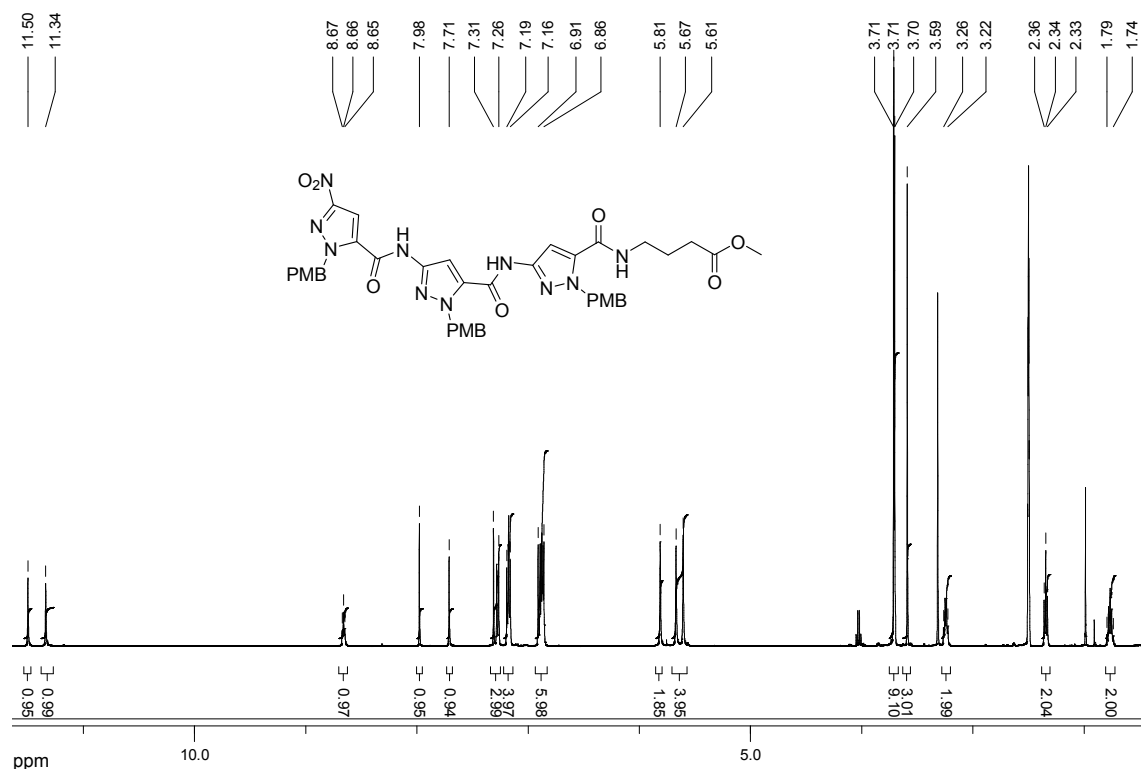
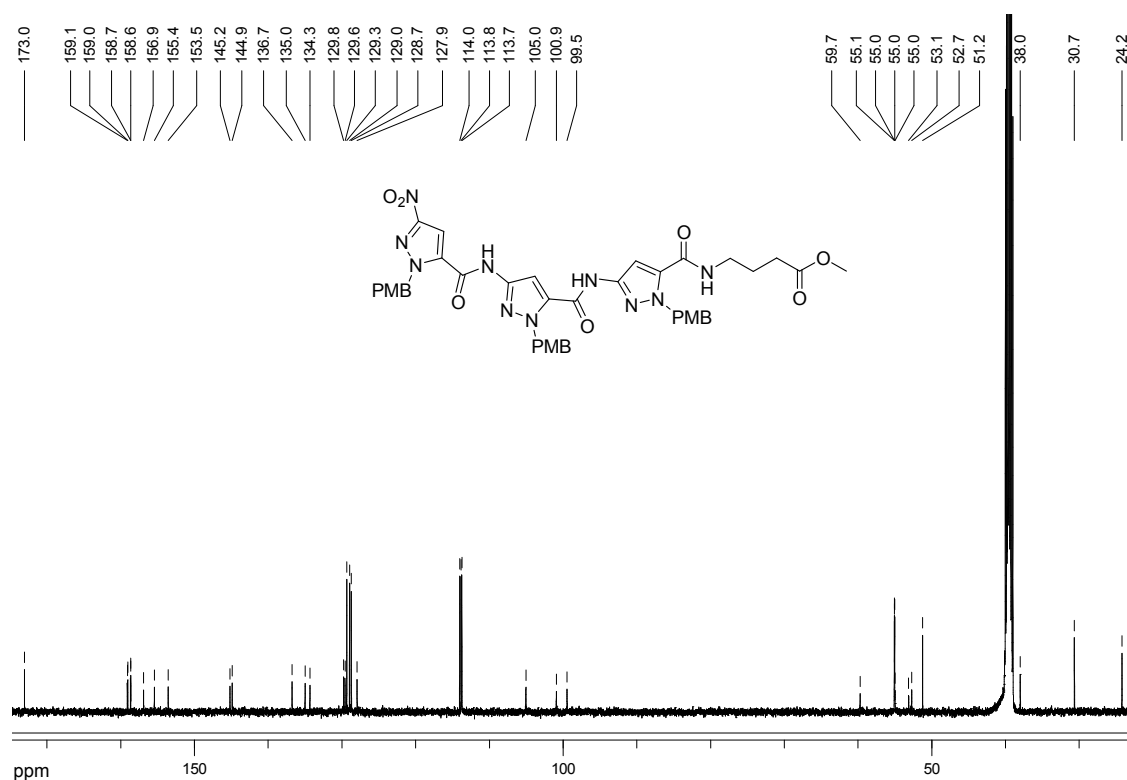


Abb. 135:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **47** (DMSO- $d_6$ , 298 K, 125 MHz).

**6.19 NMR-Spektren von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester **37****



**Abb. 136:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **37** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 137:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **37** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.20 NMR-Spektren von 4-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäuremethylester **38**

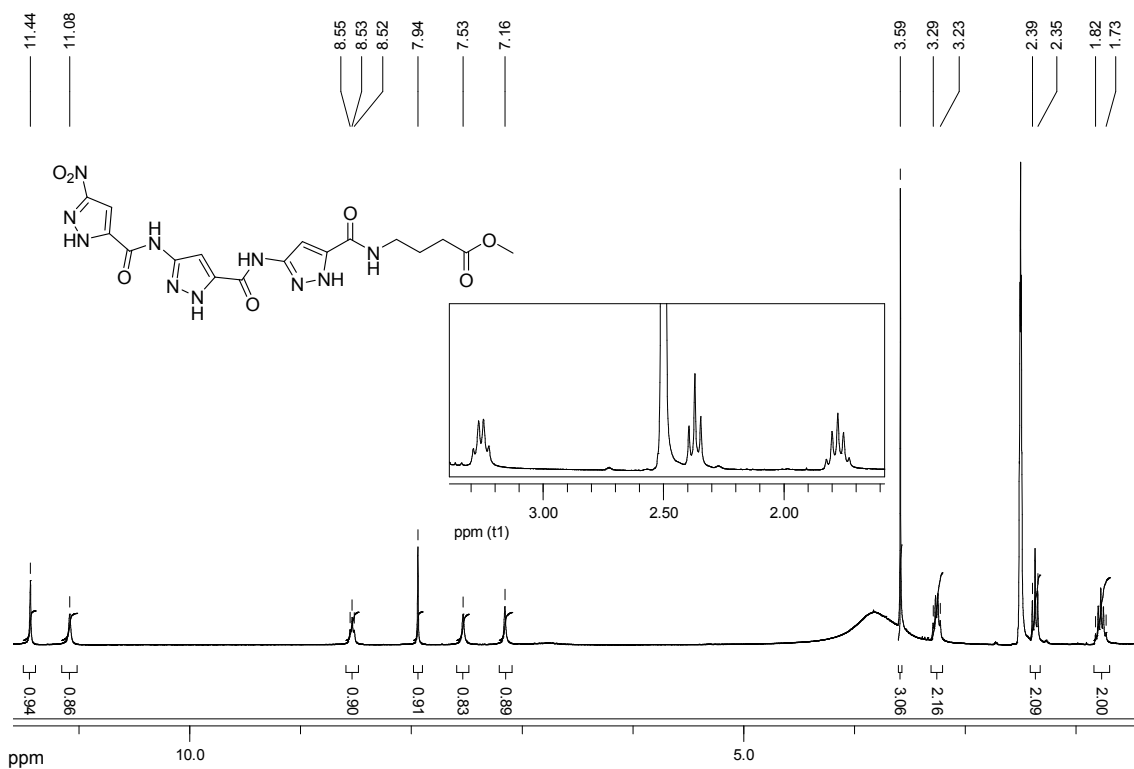


Abb. 138: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **38** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

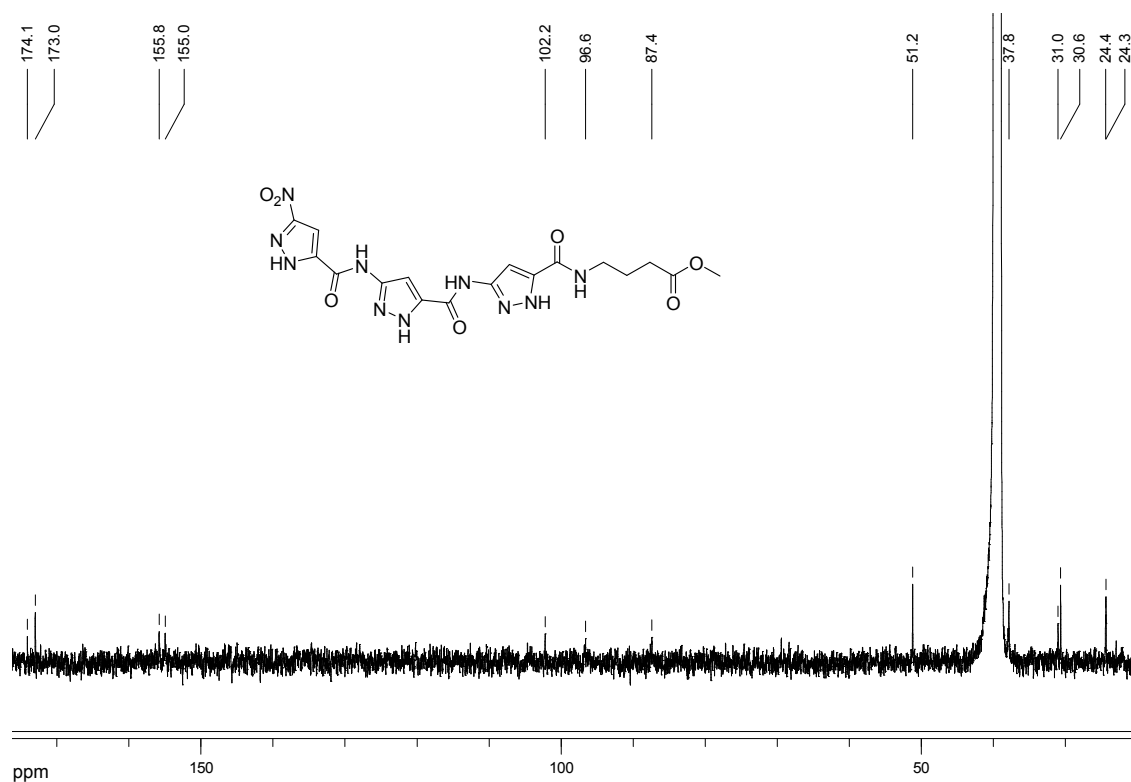


Abb. 139: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **38** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).



## 6.21 NMR-Spektren von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäure **39**

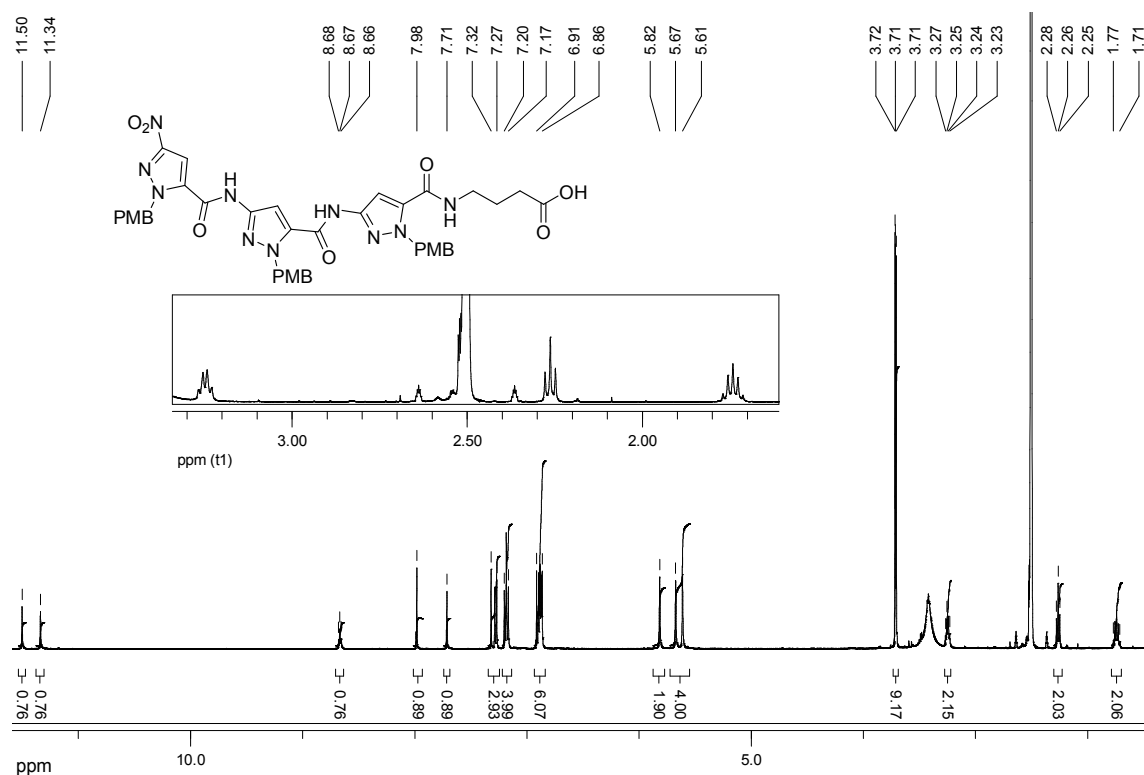


Abb. 140:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **39** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

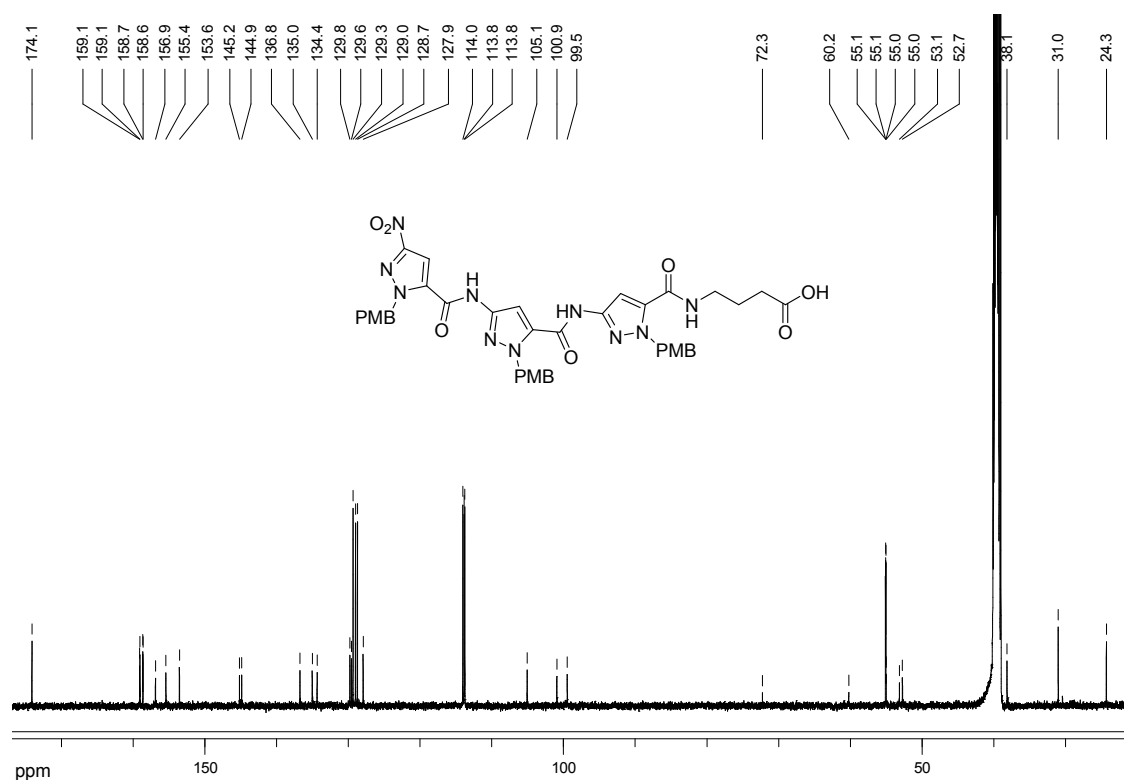
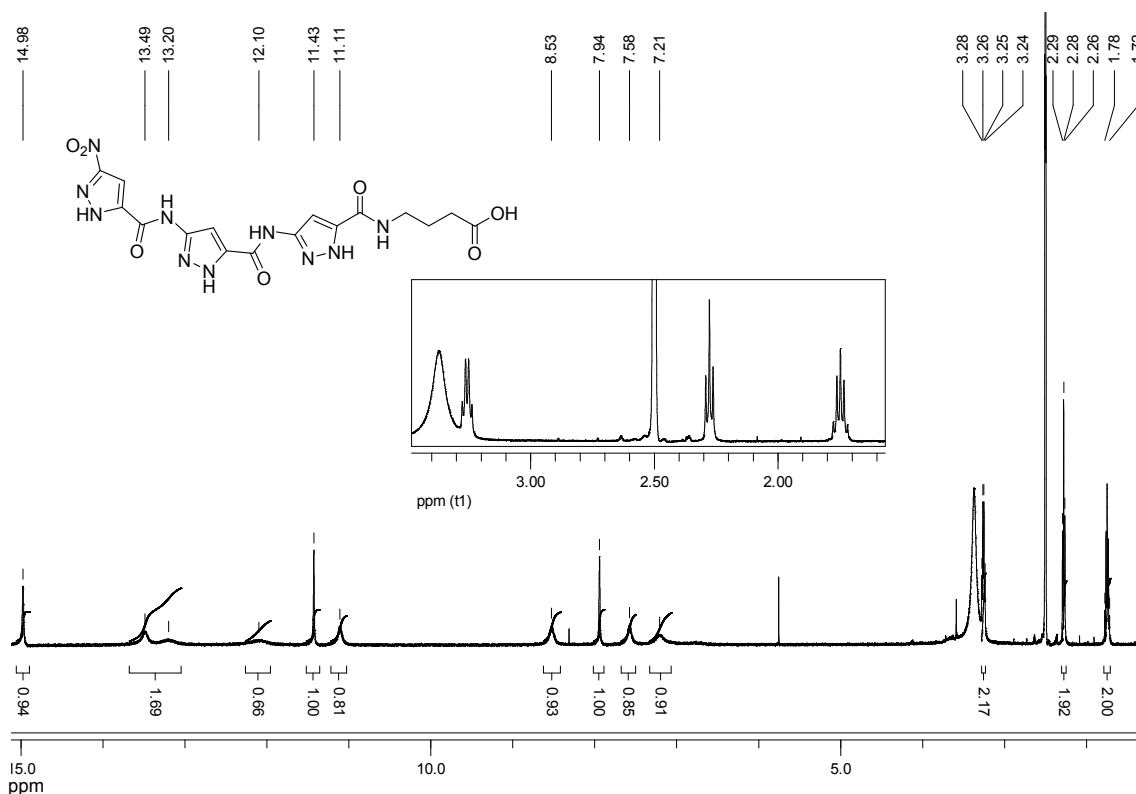
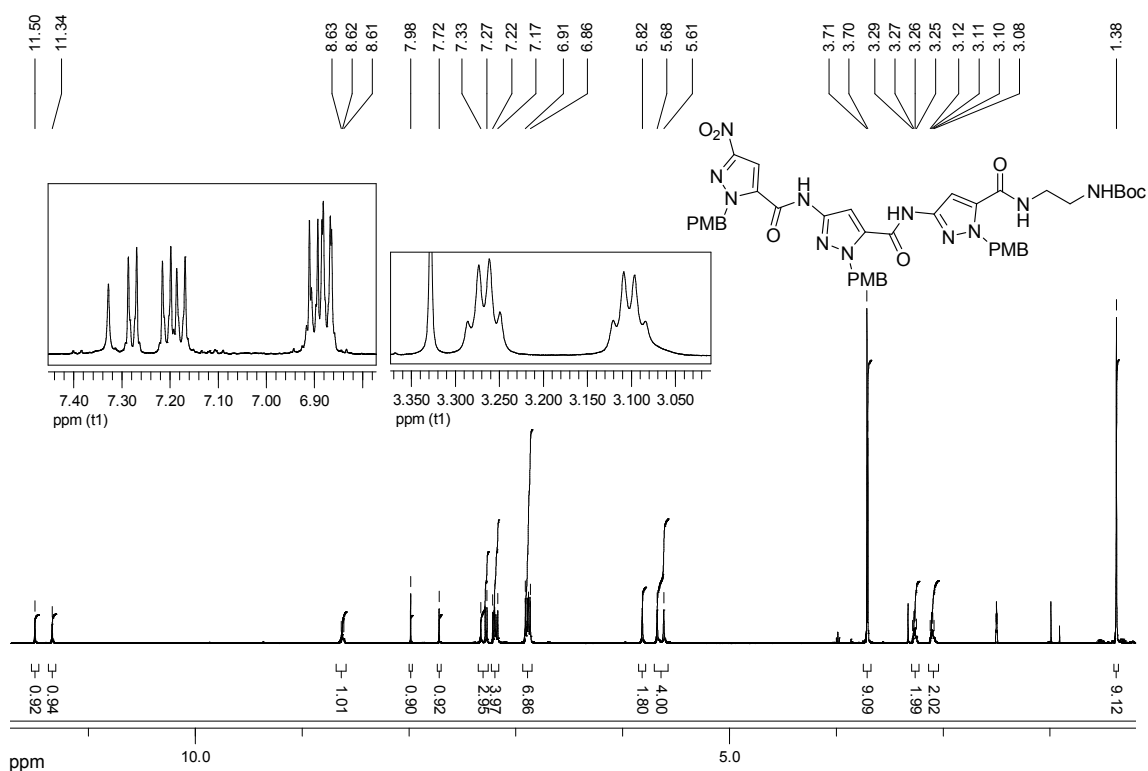


Abb. 141:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **39** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

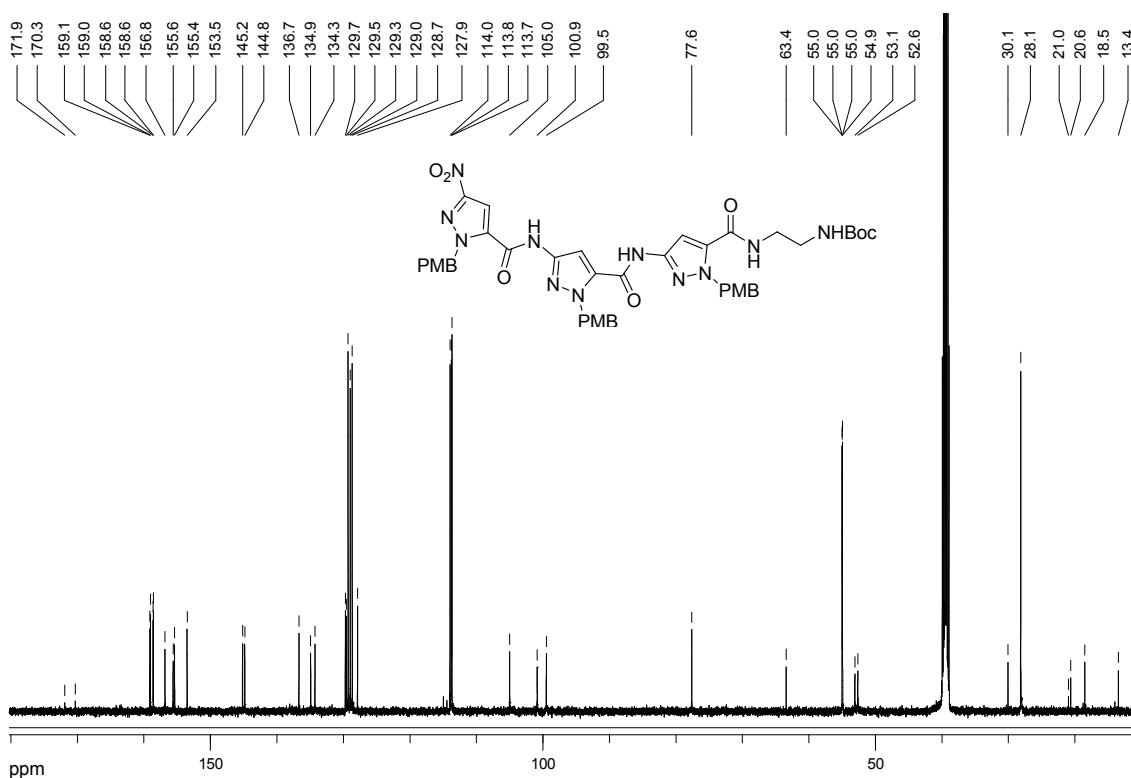
## 6.22 NMR-Spektren von 4-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)butansäure **40**



**6.23 NMR-Spektren von *tert*-Butyl-2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)ethylcarbammat **42****



**Abb. 144:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **42** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 145:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **42** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.24 NMR-Spektren von *N*-(2-Aminoethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **43**

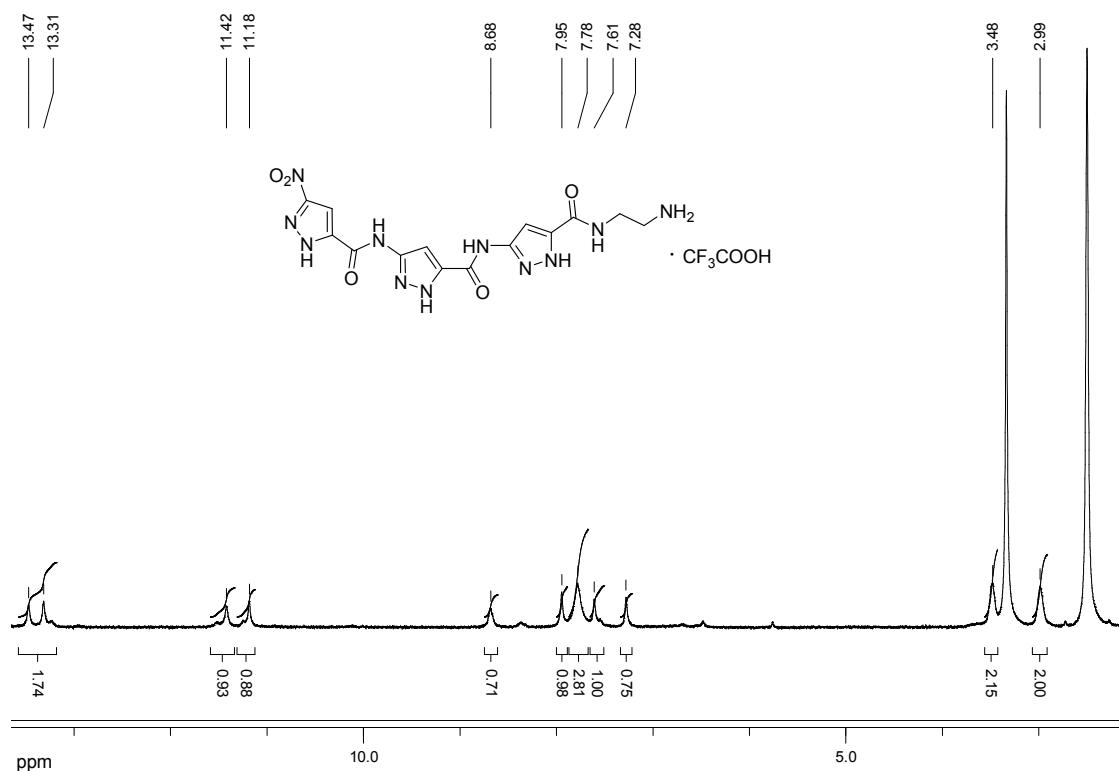


Abb. 146: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **43** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

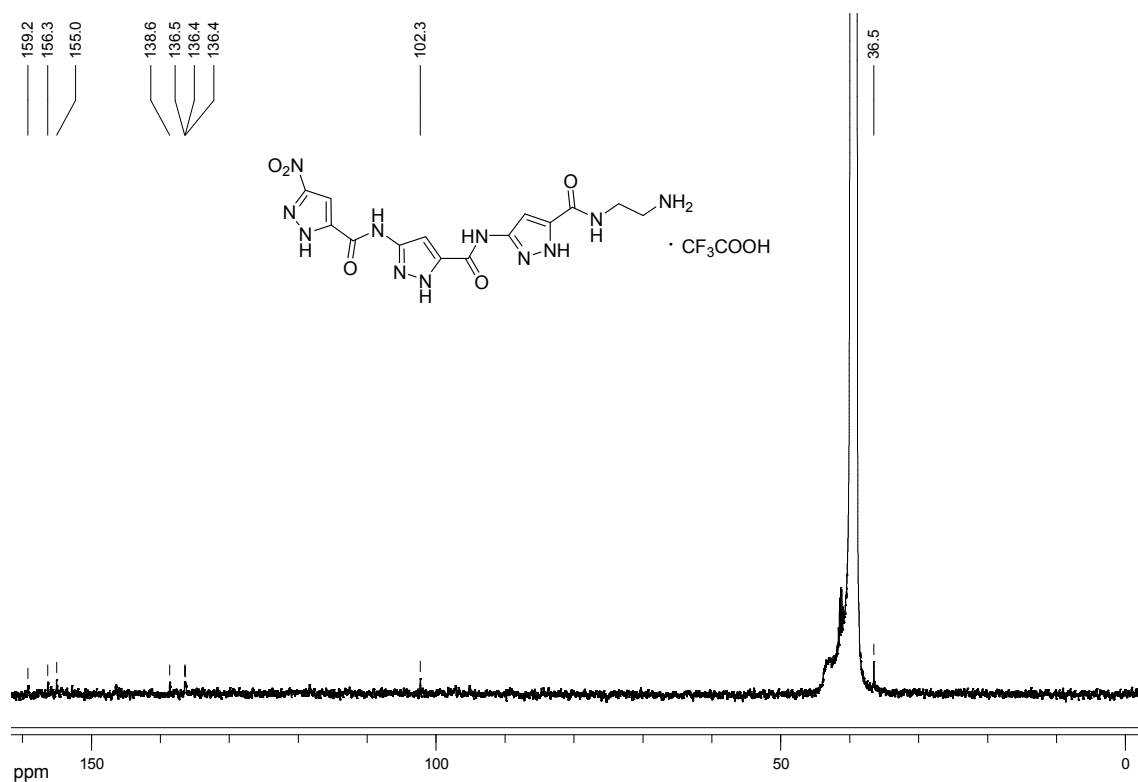
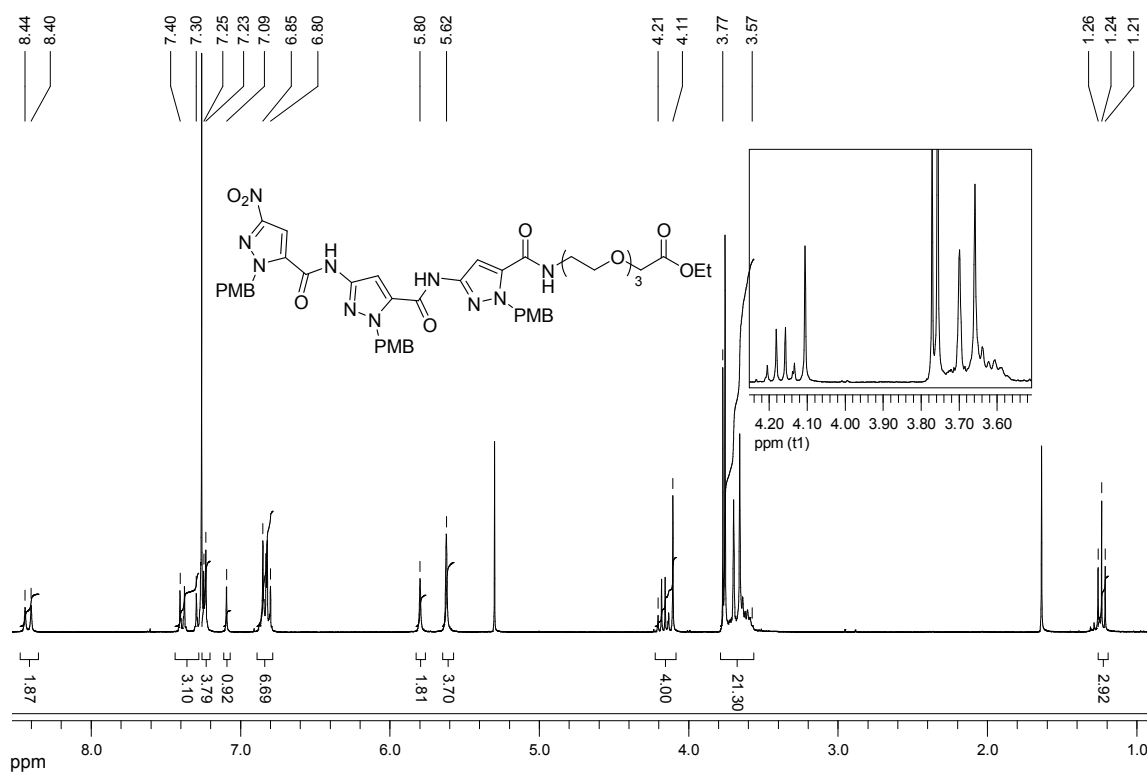
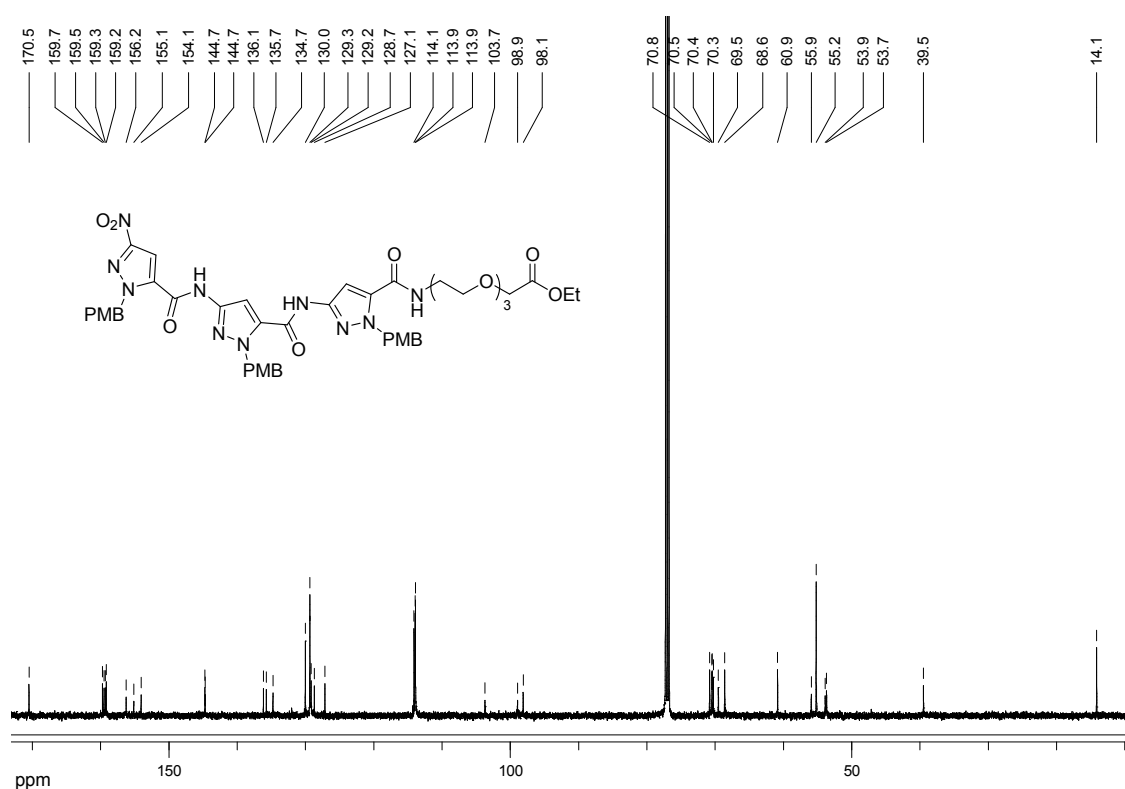


Abb. 147: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **43** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.25 NMR-Spektren von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säureethylester **54**



**Abb. 148:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **54** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 149:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **54** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.26 NMR-Spektren von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridec-13-säureethylester **55**

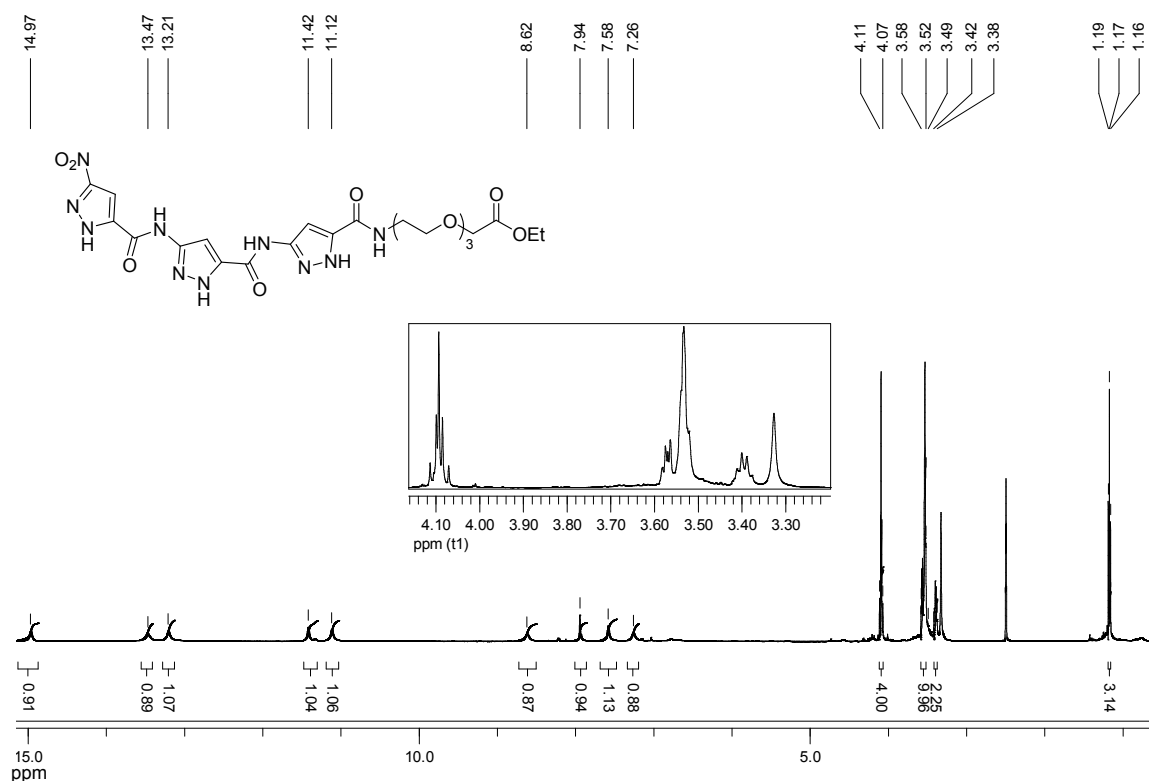


Abb. 150:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **55** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

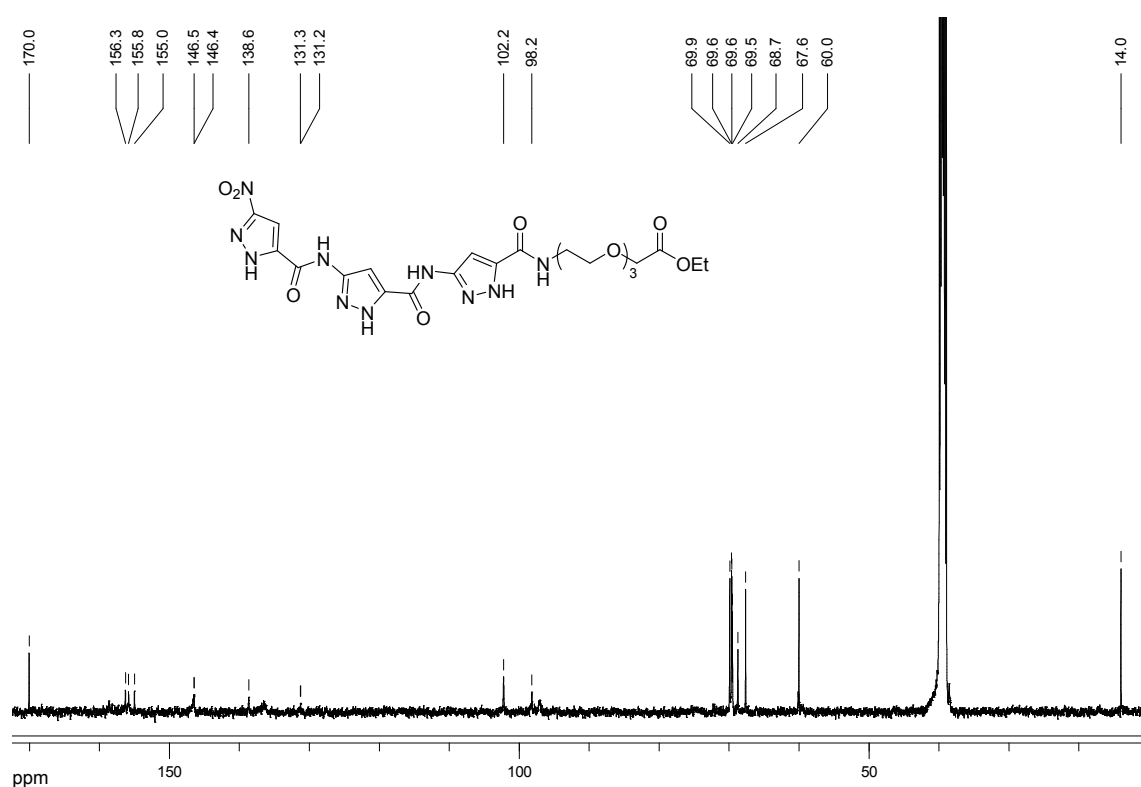
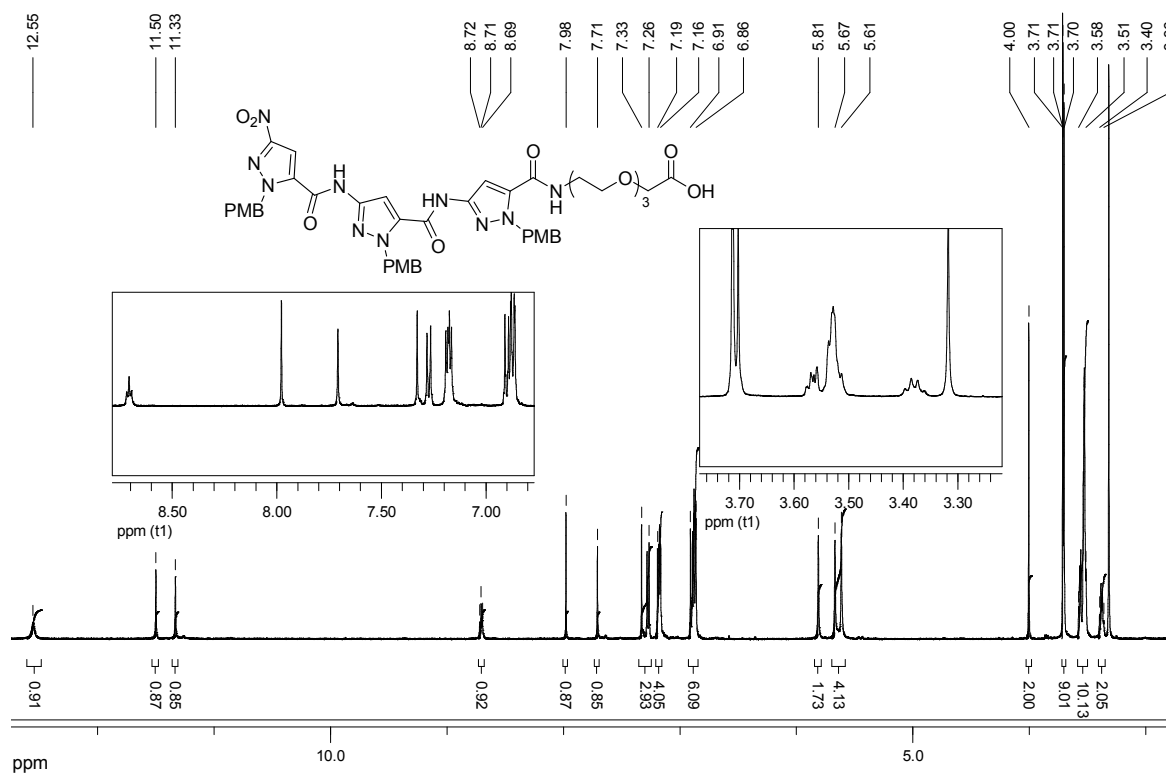
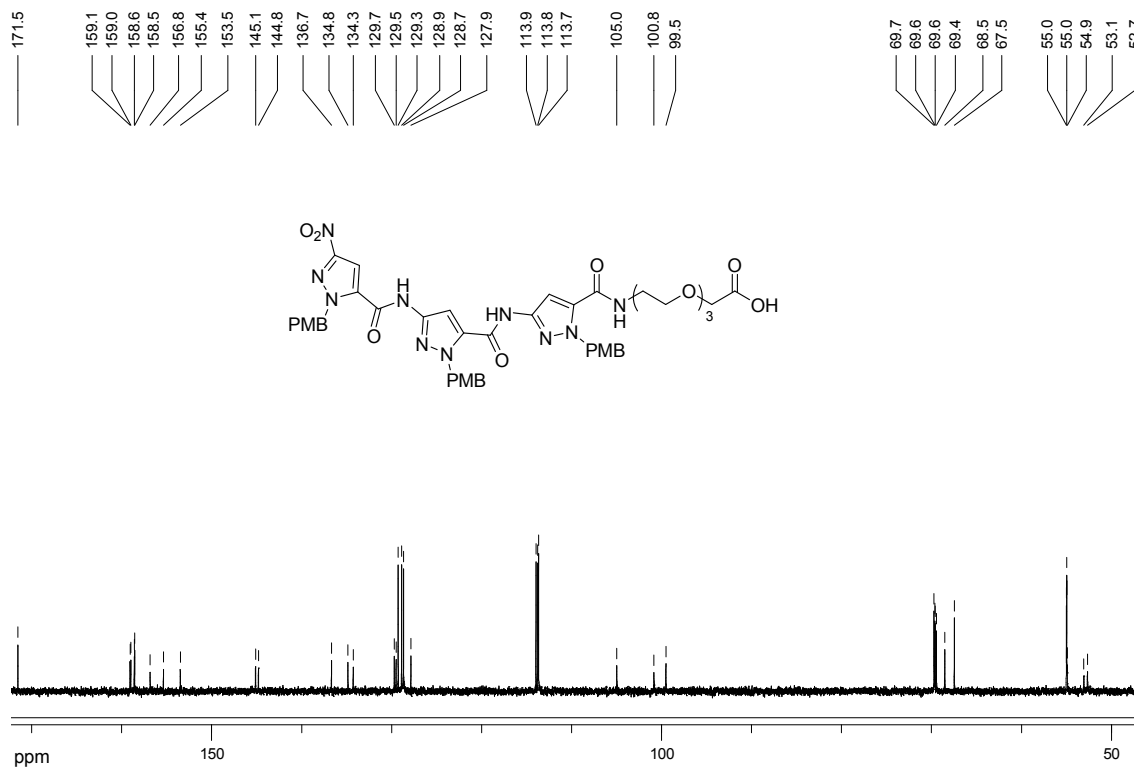


Abb. 151:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **55** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

**6.27 NMR-Spektren von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-säure **56****



**Abb. 152:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **56** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 153:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **56** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

### 6.28 NMR-Spektren von *N*-(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-1-(4-methoxy-benzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **57**

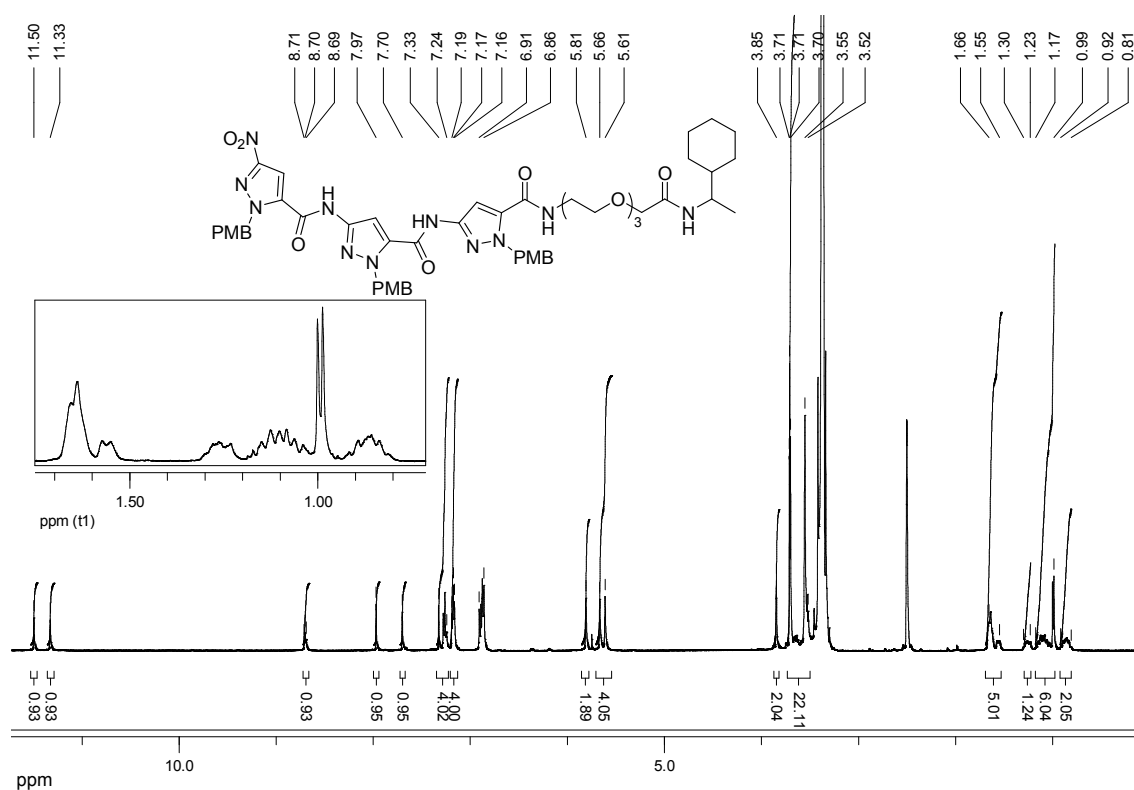


Abb. 154:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **57** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

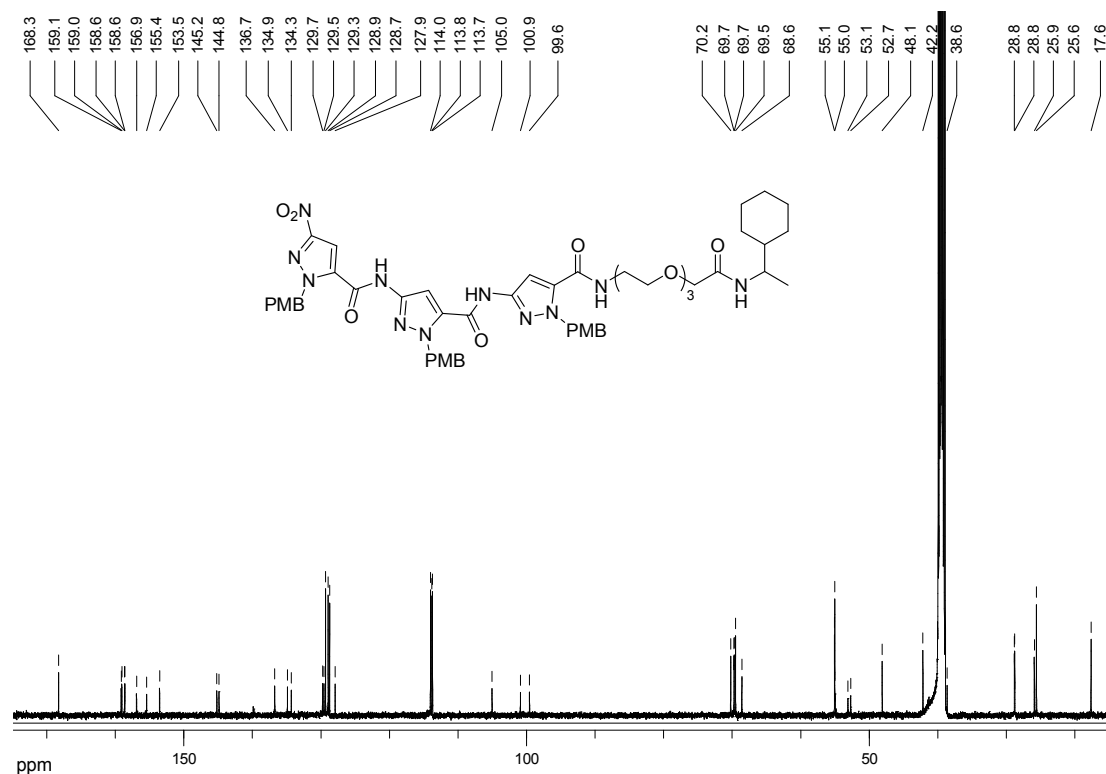


Abb. 155:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **57** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).



## 6.29 NMR-Spektren von *N*-(13-Cyclohexyl-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetradecyl)-3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid 58

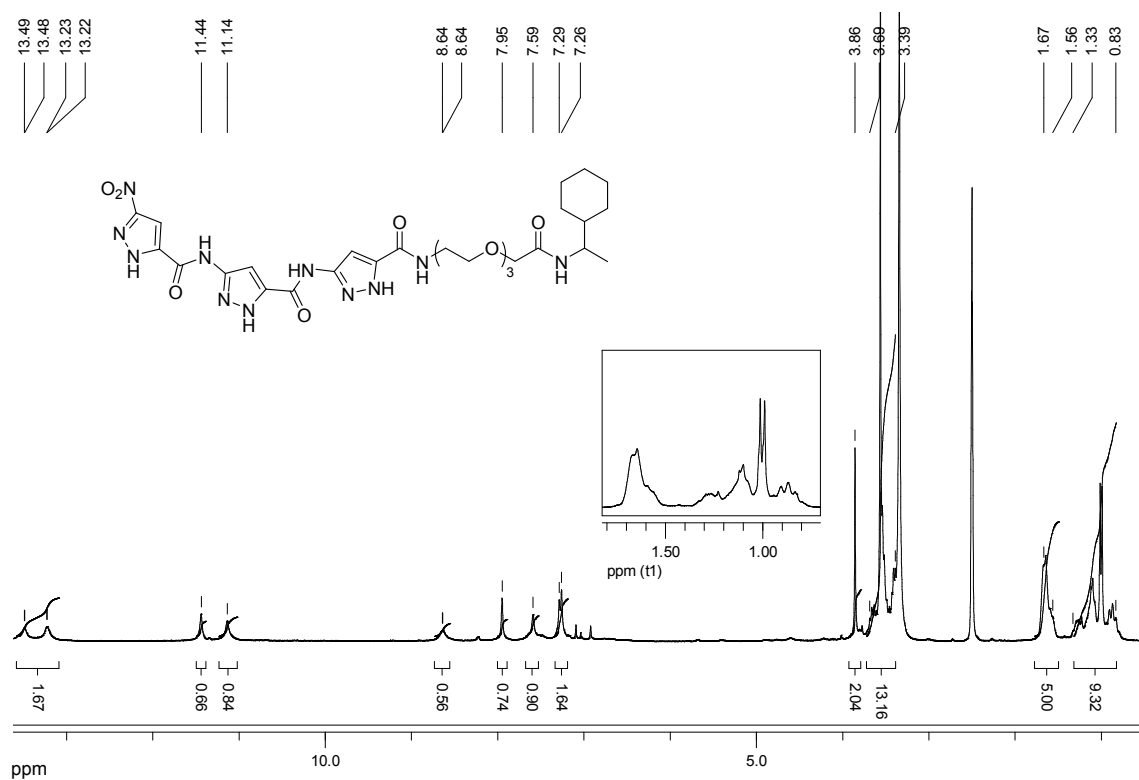


Abb. 156: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **58** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

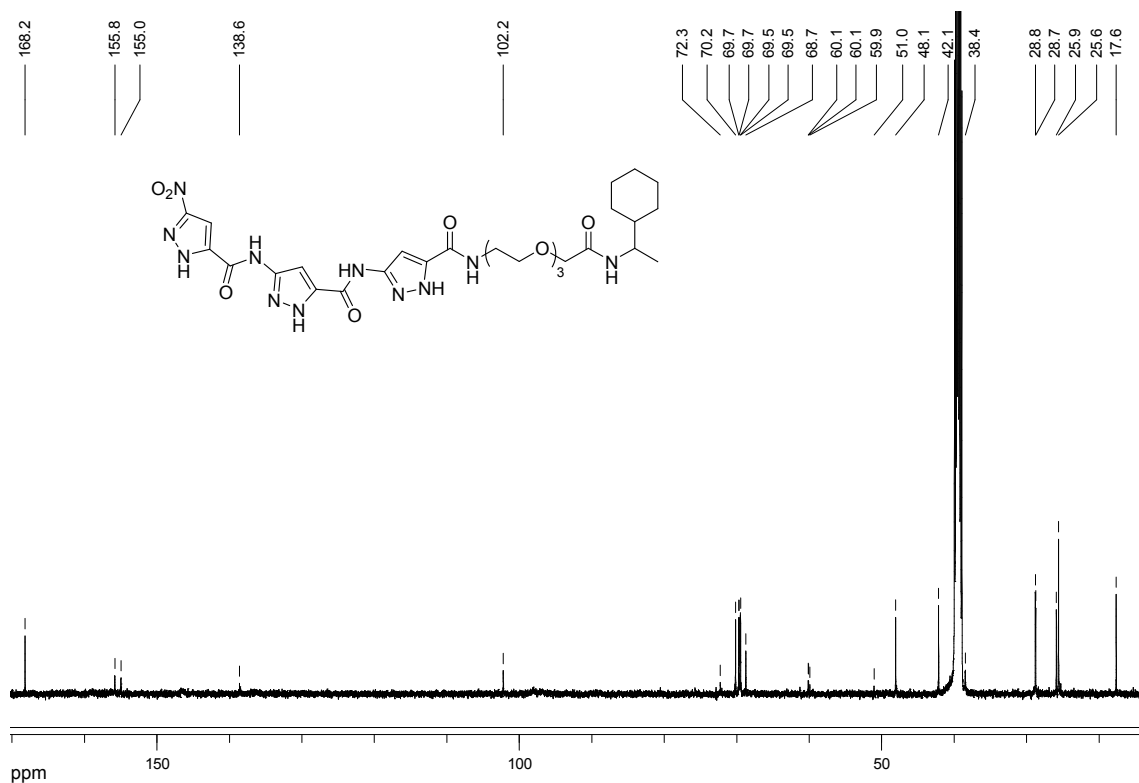
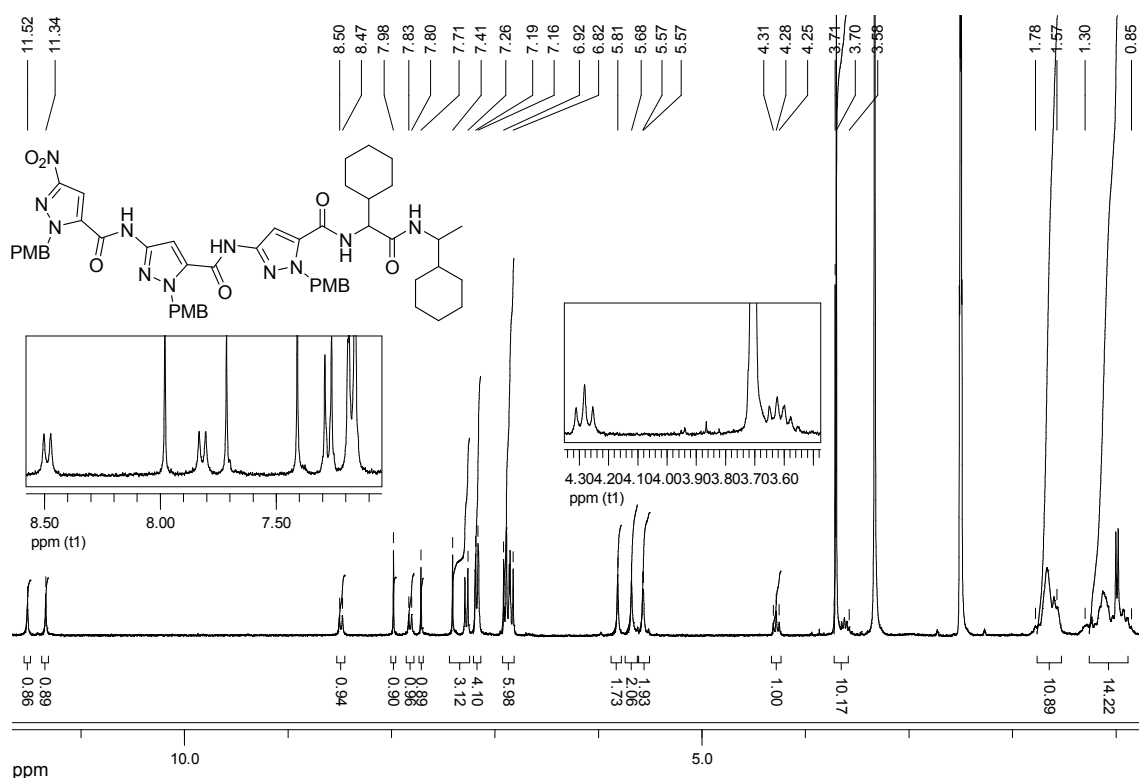
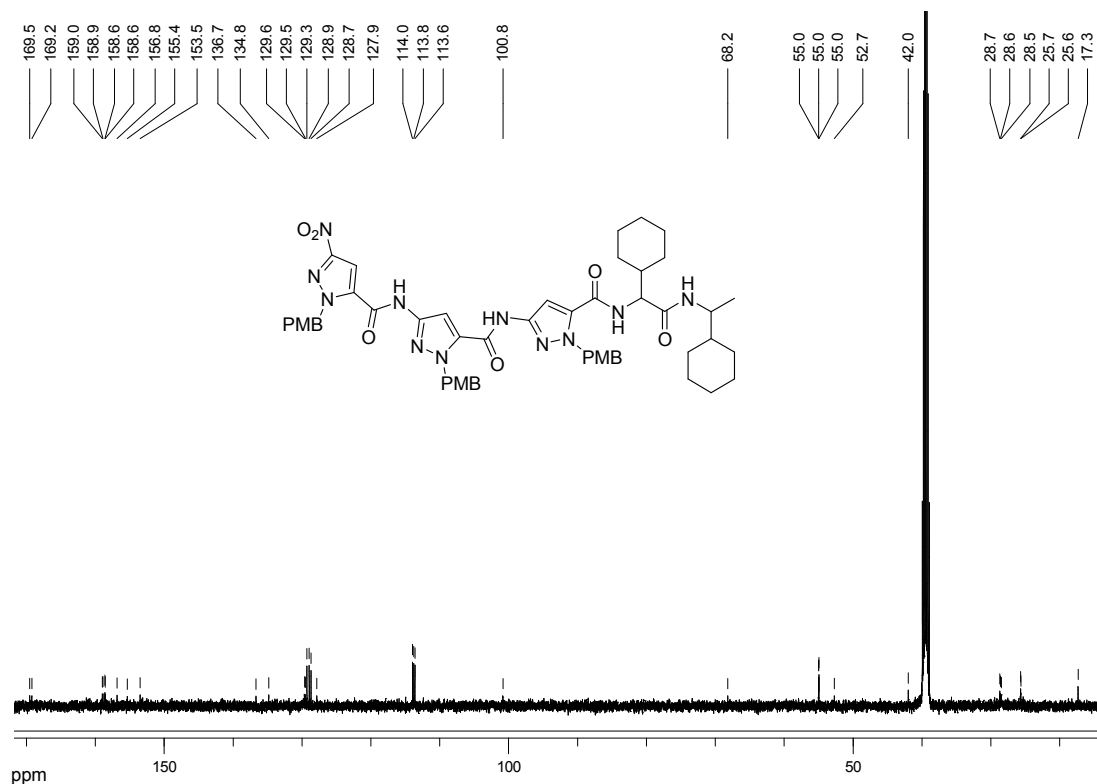


Abb. 157: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **58** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

**6.30 NMR-Spektren von *N*-(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexyletylamino)-2-oxoethyl)-1-(4-methoxy-benzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **49****



**Abb. 158:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **49** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).



**Abb. 159:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **49** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 125 MHz).

### 6.31 NMR-Spektren von *N*-(1-Cyclohexyl-2-(1-cyclohexyletylamino)-2-oxoethyl)-3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **50**

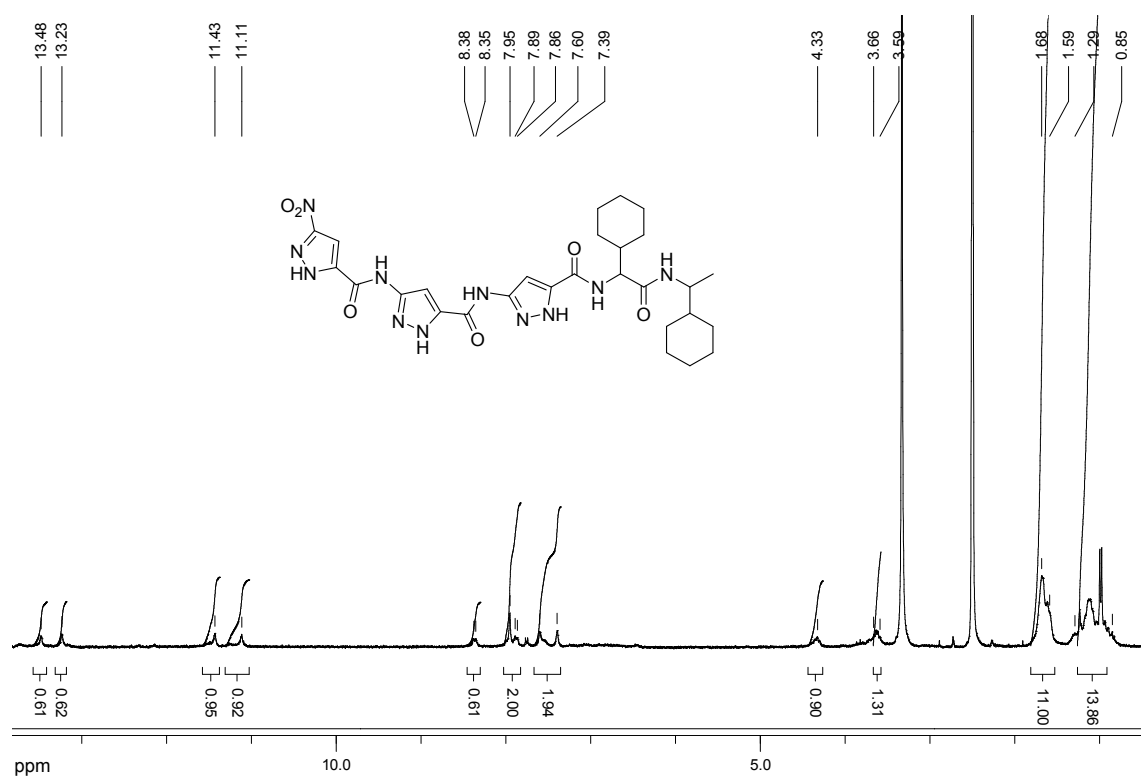


Abb. 160: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **50** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

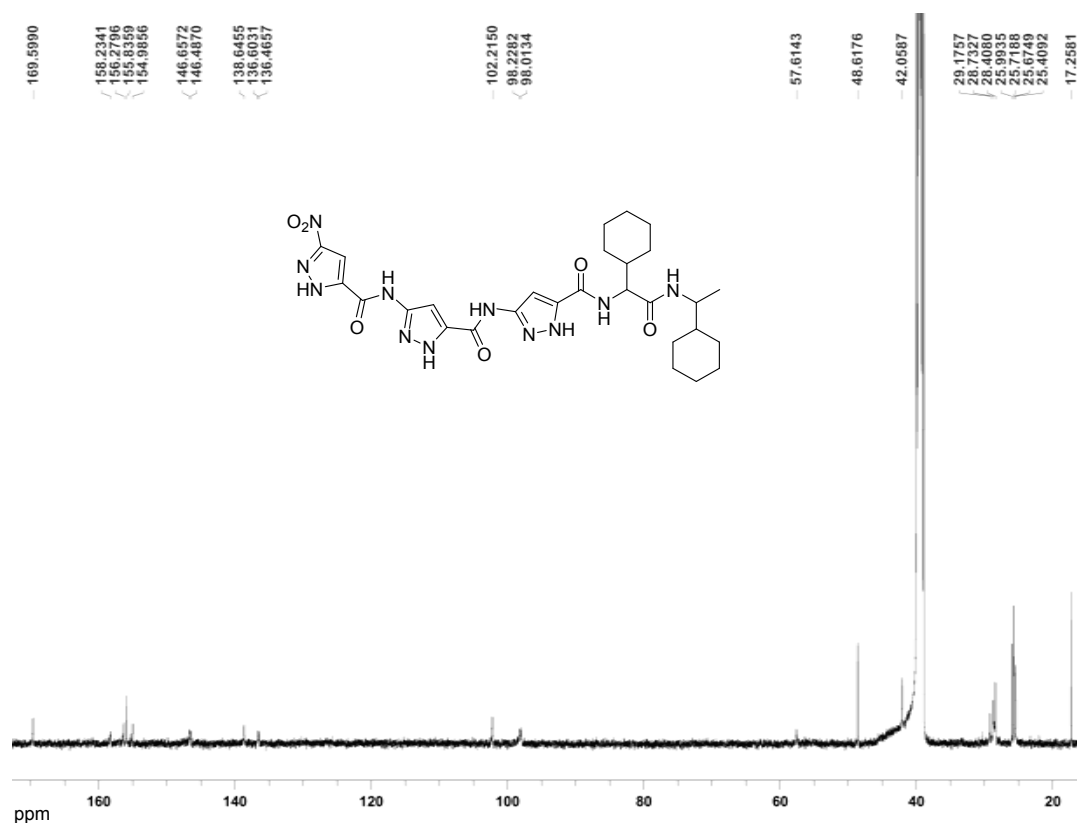
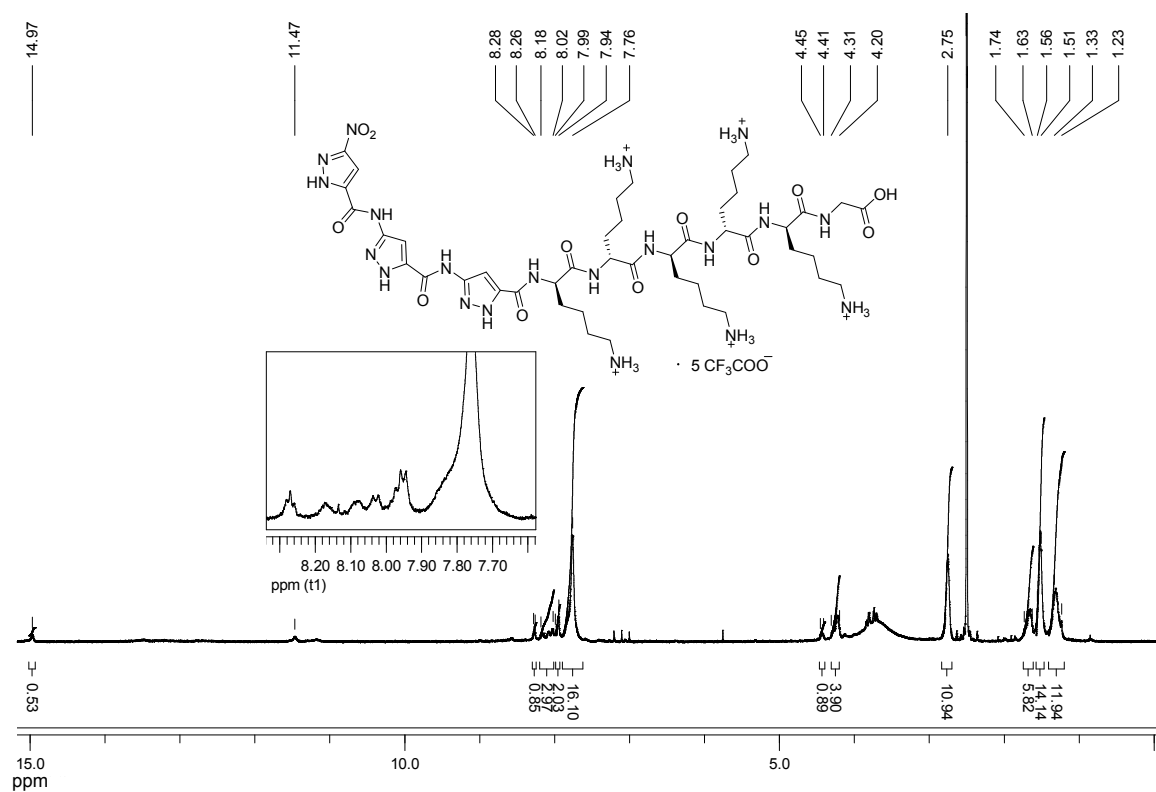
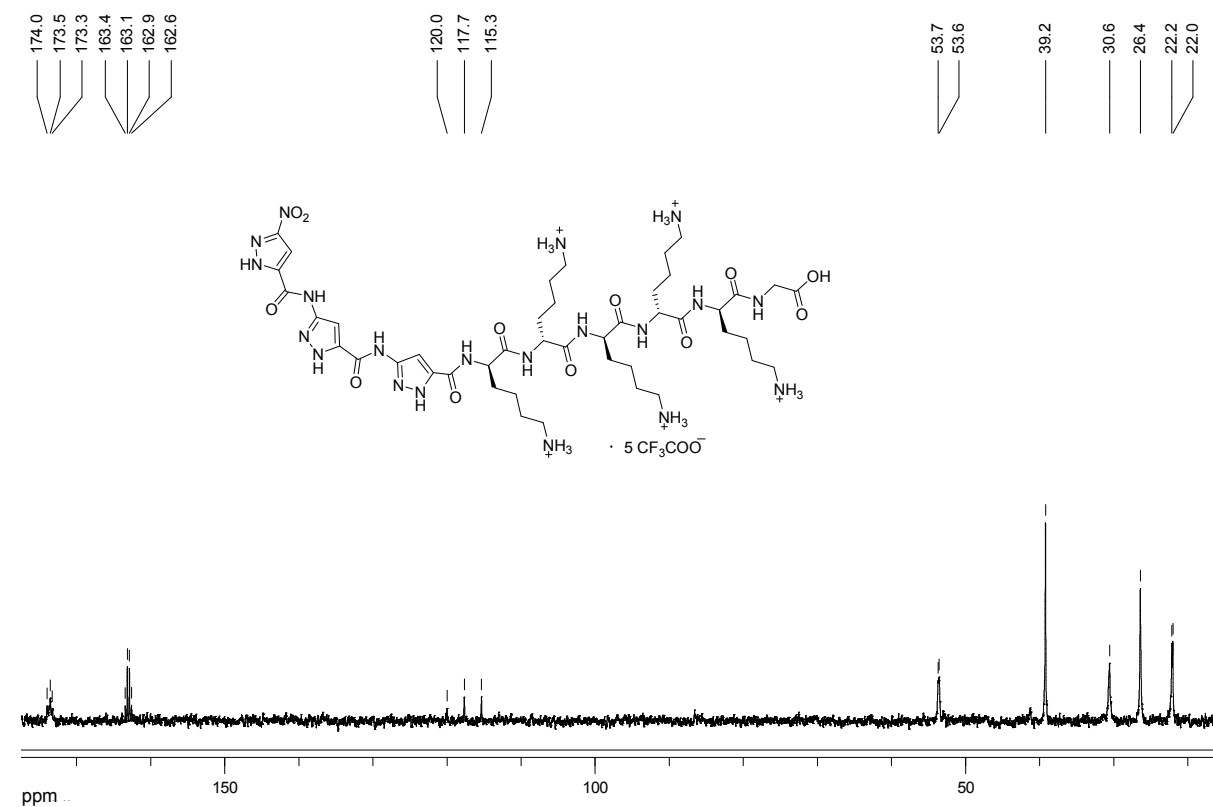
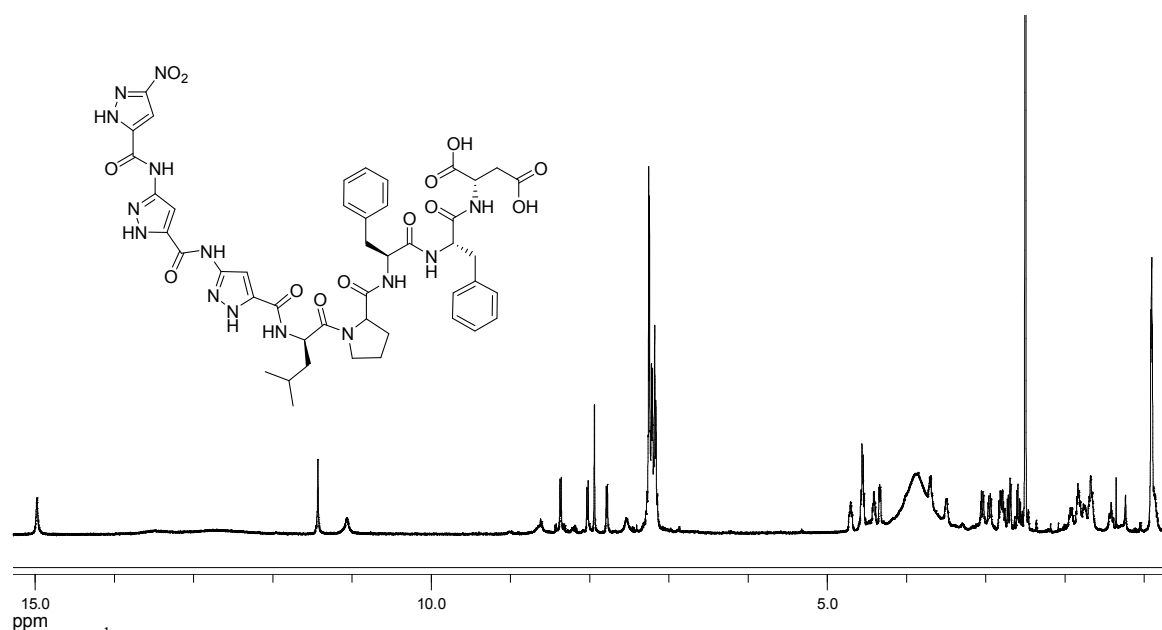
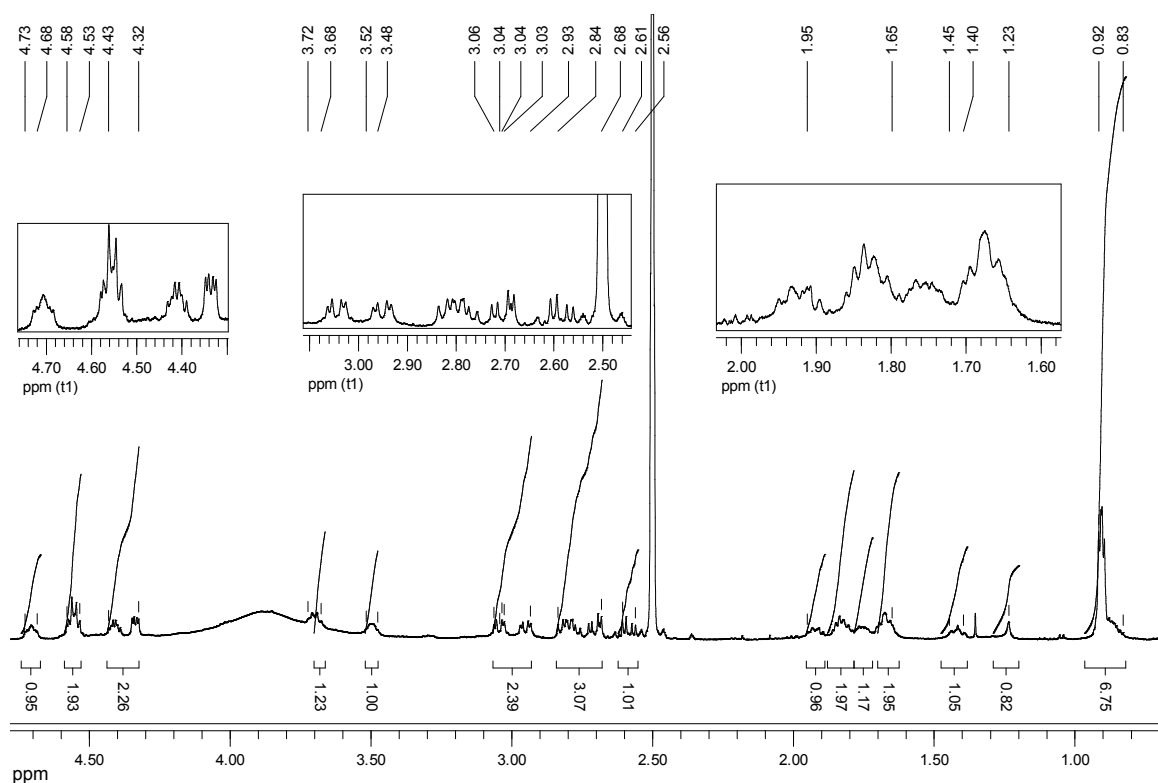


Abb. 161: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **50** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.32 NMR-Spektren von Trimer-KKKKKG 59

Abb. 162: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **59** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).Abb. 163: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **59** (CD<sub>3</sub>OD, 298 K, 125 MHz).

## 6.33 NMR-Spektren von Trimer-LPFFD 60

Abb. 164:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **60** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).Abb. 165:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **60** (DMSO- $\text{d}_6$ , 298 K, 500 MHz).

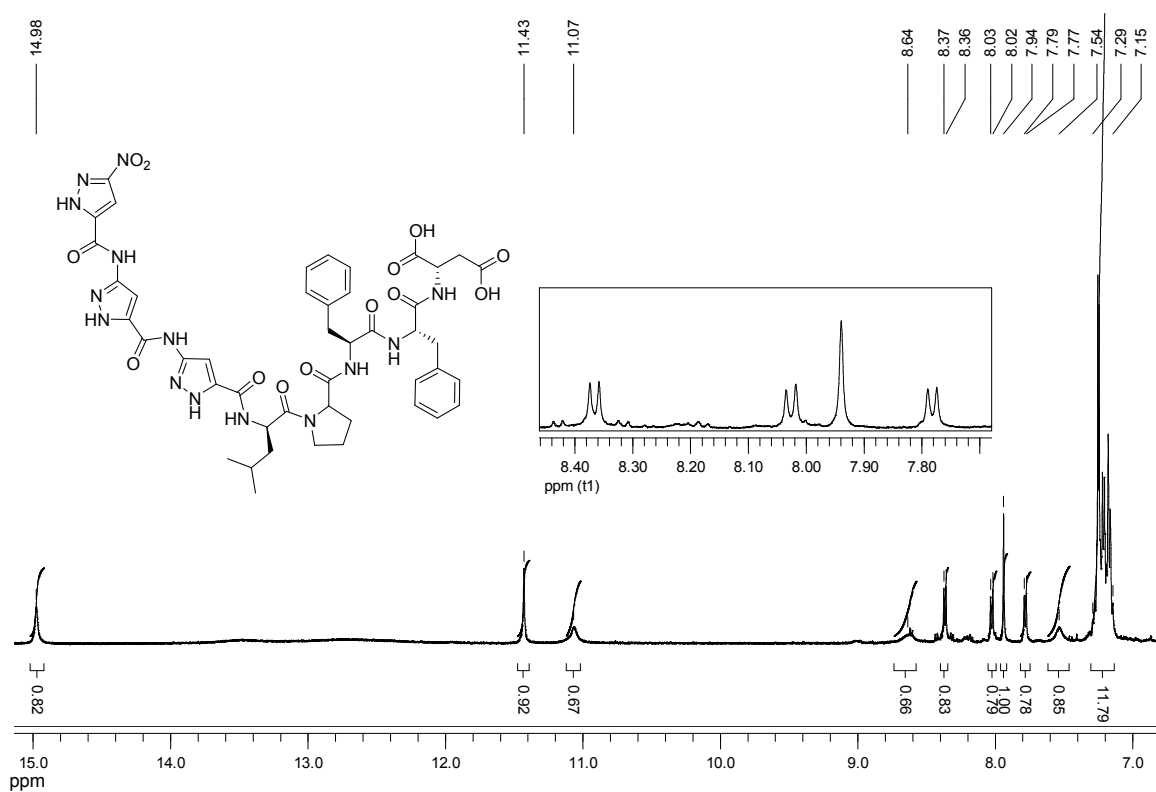


Abb. 166: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **60** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

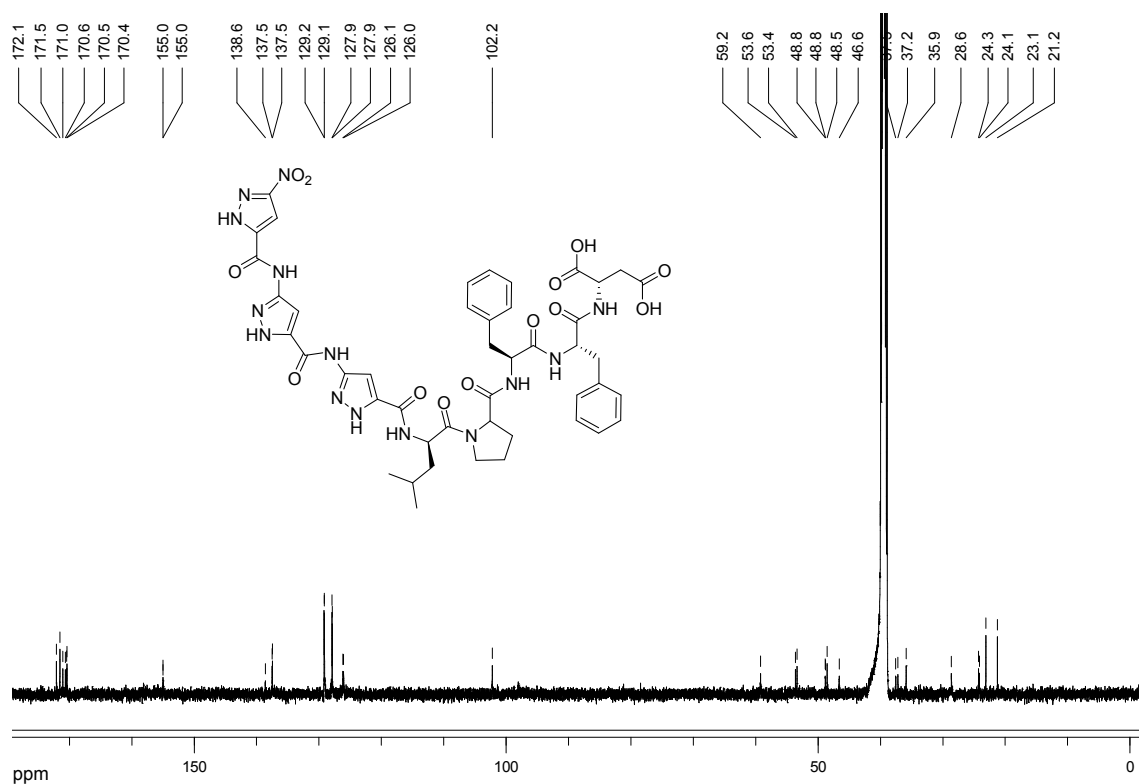
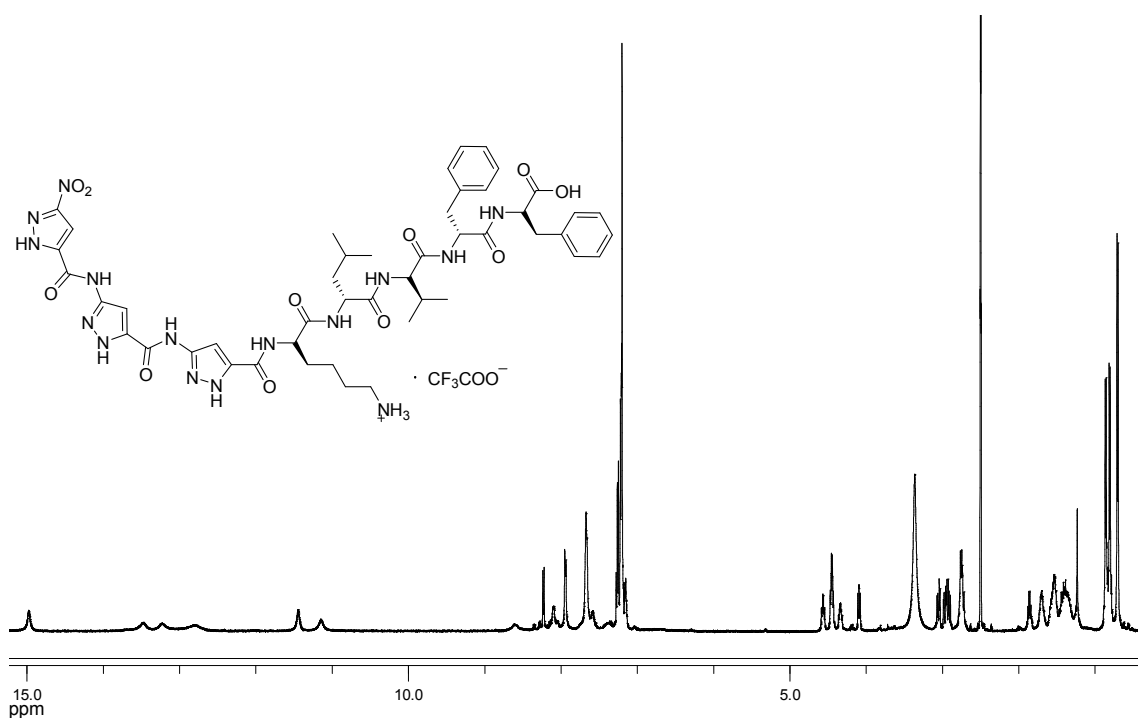
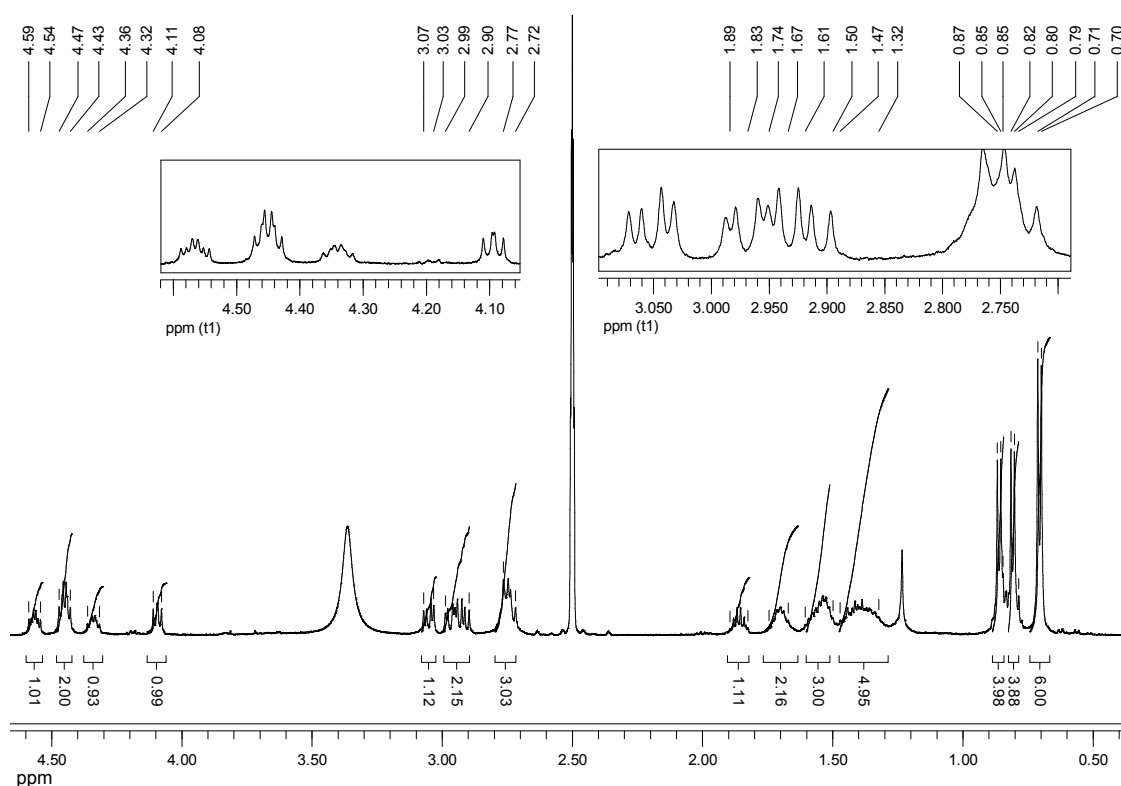


Abb. 167: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **60** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 6.34 NMR-Spektren von Trimer-KLVFF 61

Abb. 168: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **61** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).Abb. 169: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **61** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

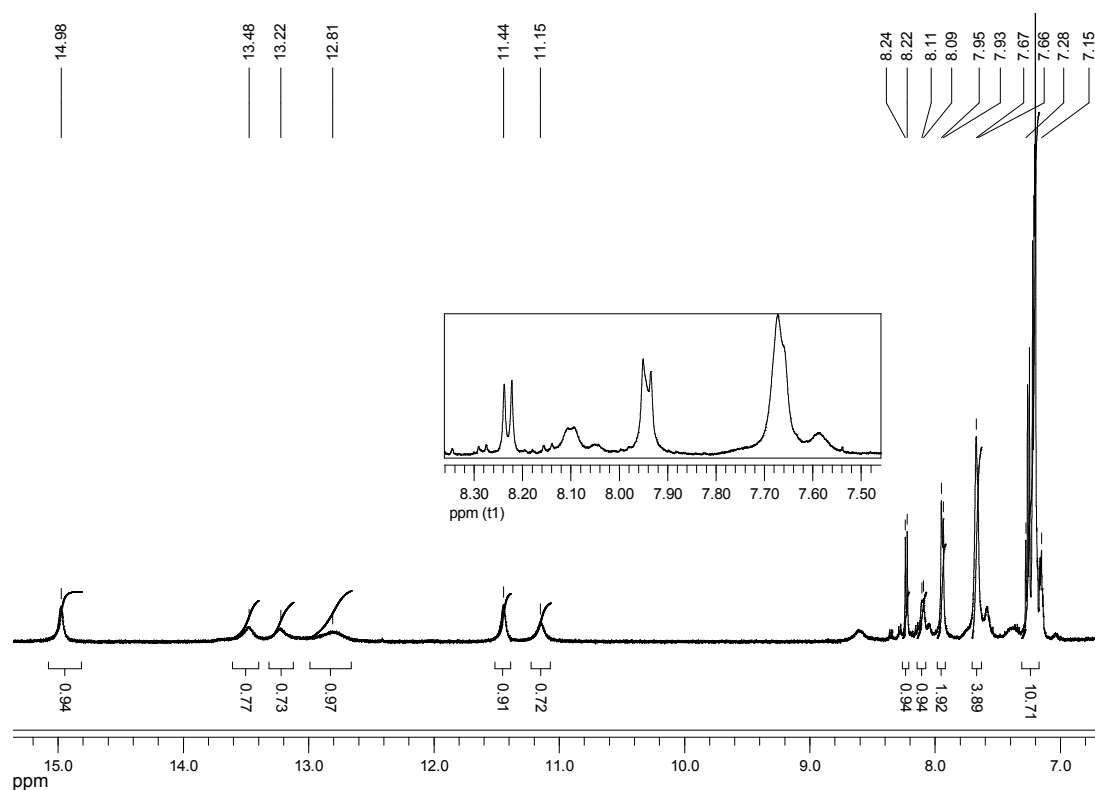


Abb. 170: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **61** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

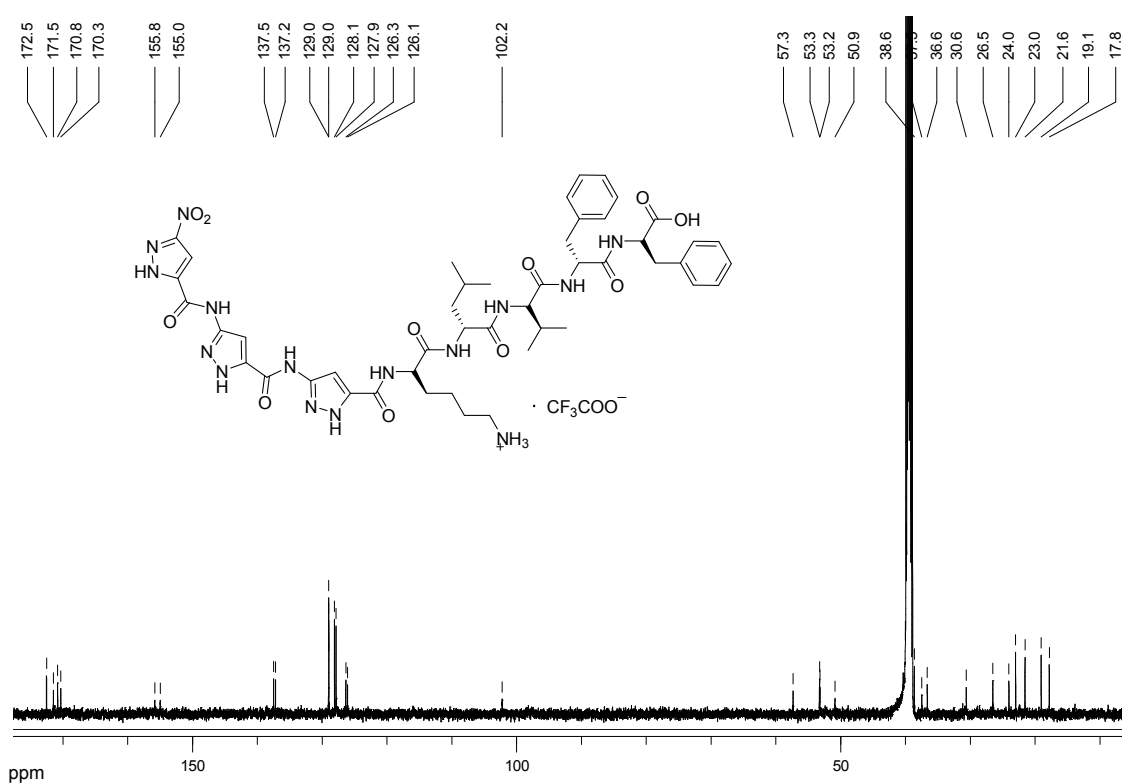


Abb. 171: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **61** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).



### 6.35 NMR-Spektren von Methyl-2-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-methylpropanamido)-acetat **91**

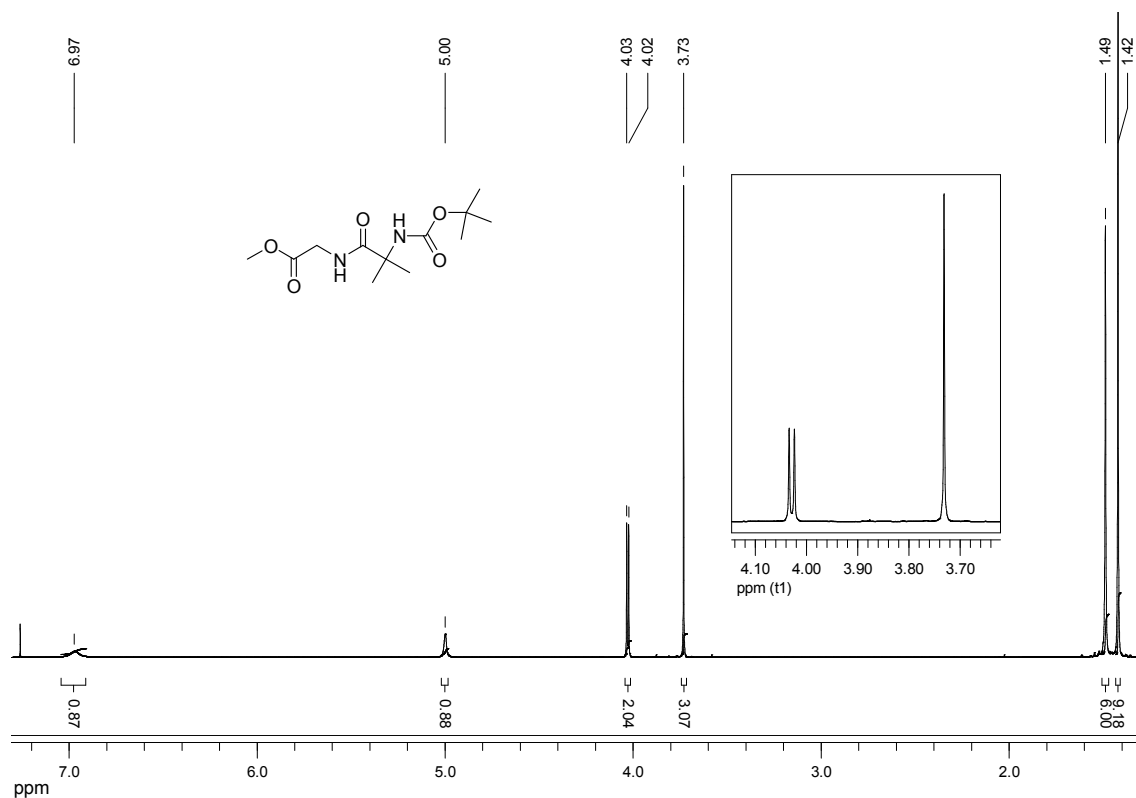


Abb. 172: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **91** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

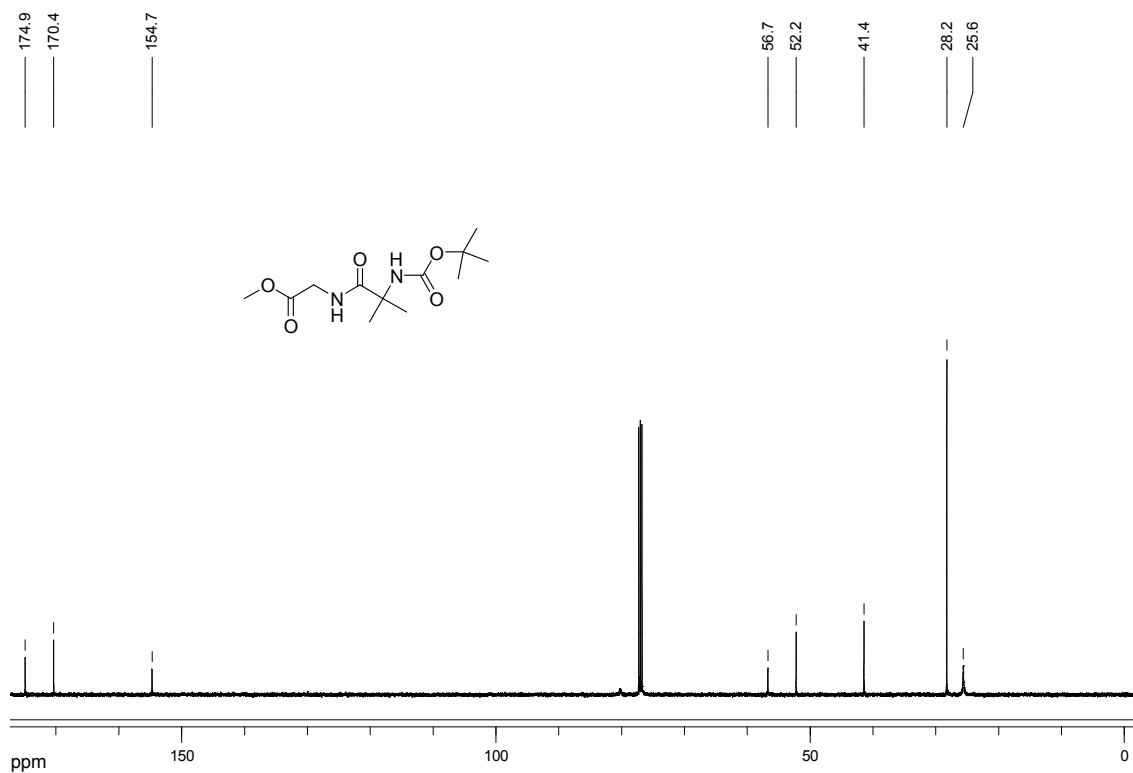


Abb. 173: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **91** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

### 6.36 NMR-Spektren von *tert*-Butyl-1-(2-(isopropylamino)-2-oxoethylamino)-2-methyl-1-oxopropanylcarbammat **93**

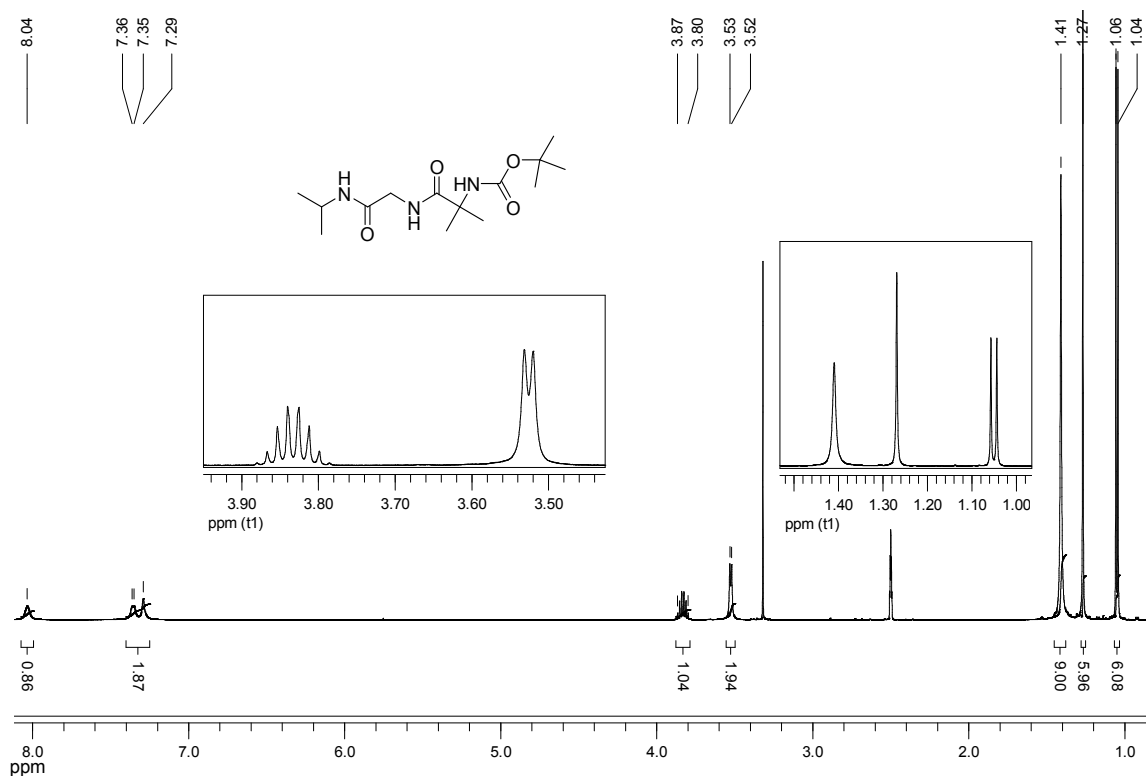


Abb. 174: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **93** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

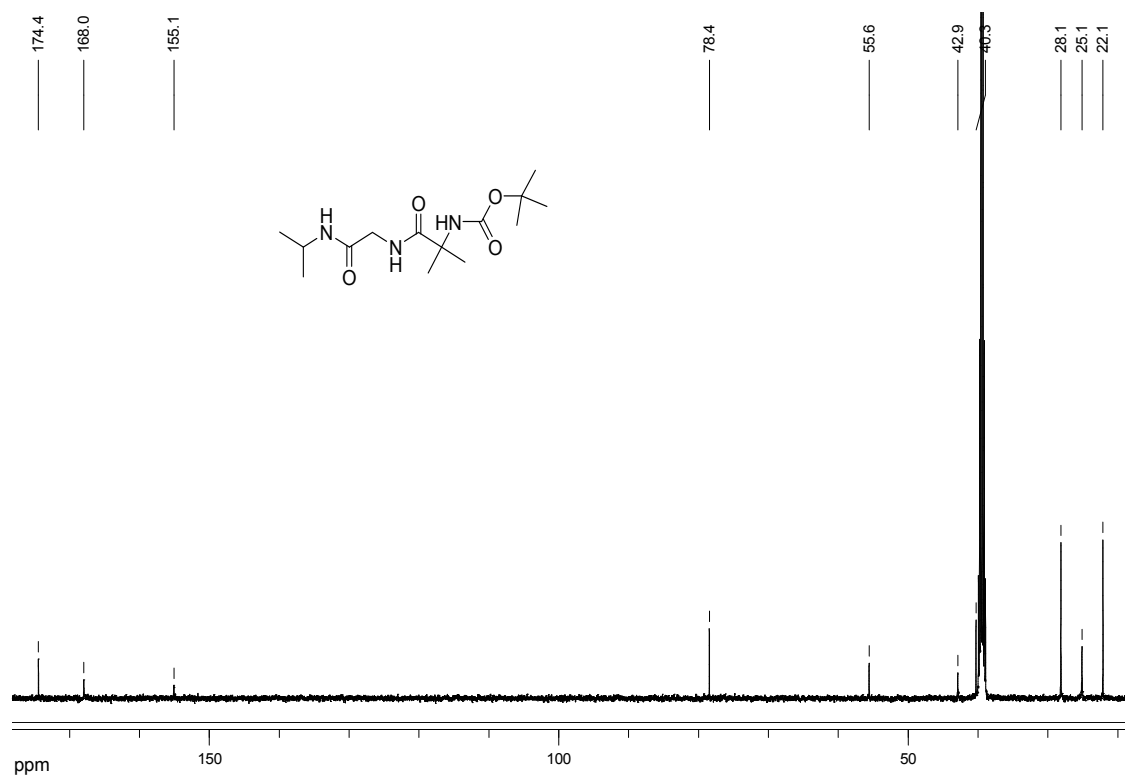
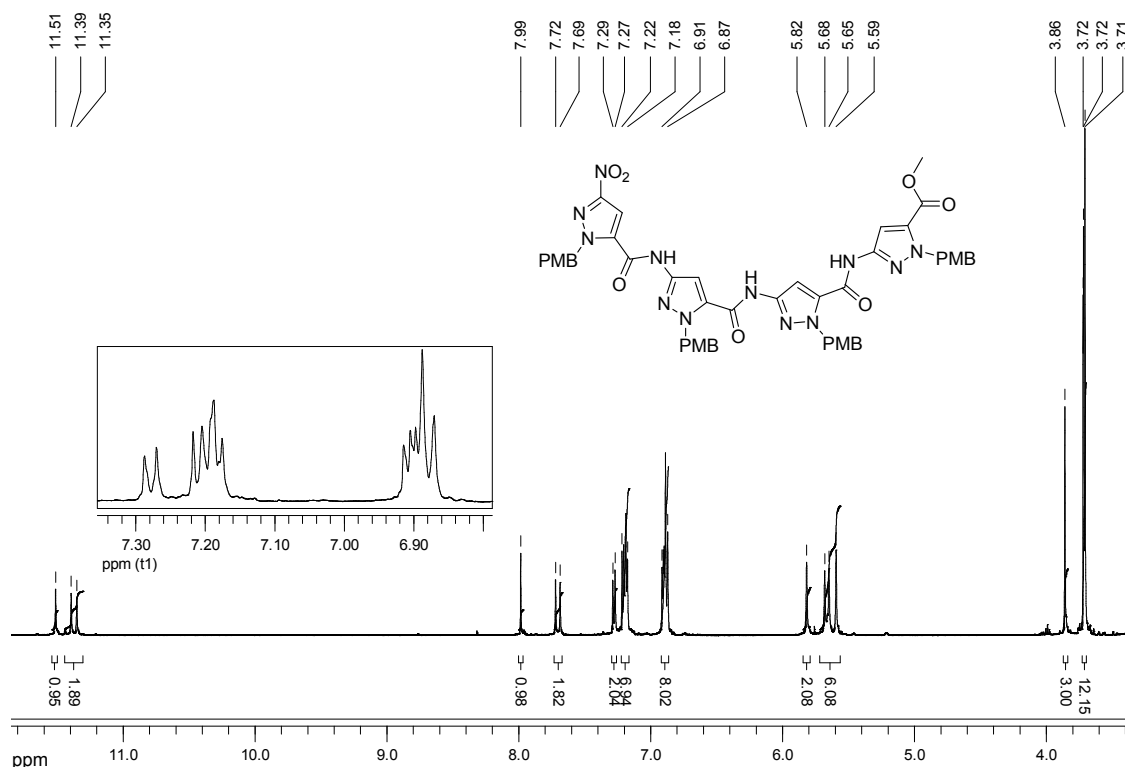
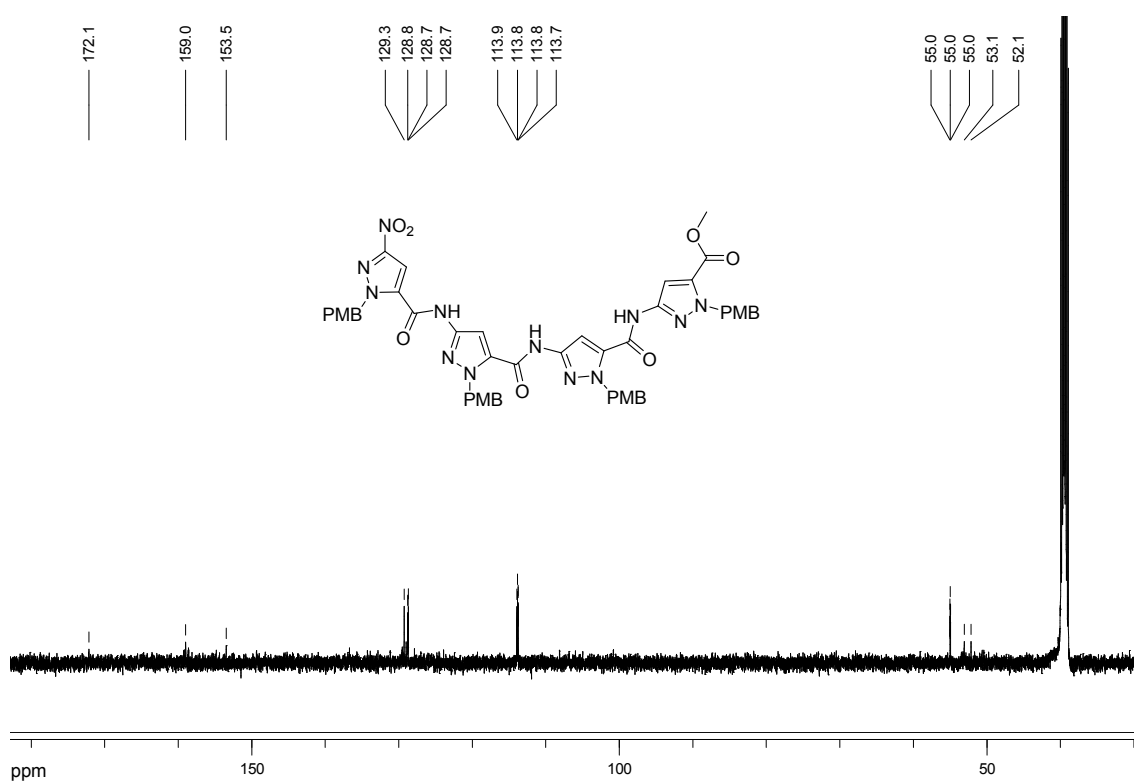


Abb. 175: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **93** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

**6.37 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 97**



**Abb. 176:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **97** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).



**Abb. 177:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **97** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

### 6.38 NMR-Spektren von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure **98**

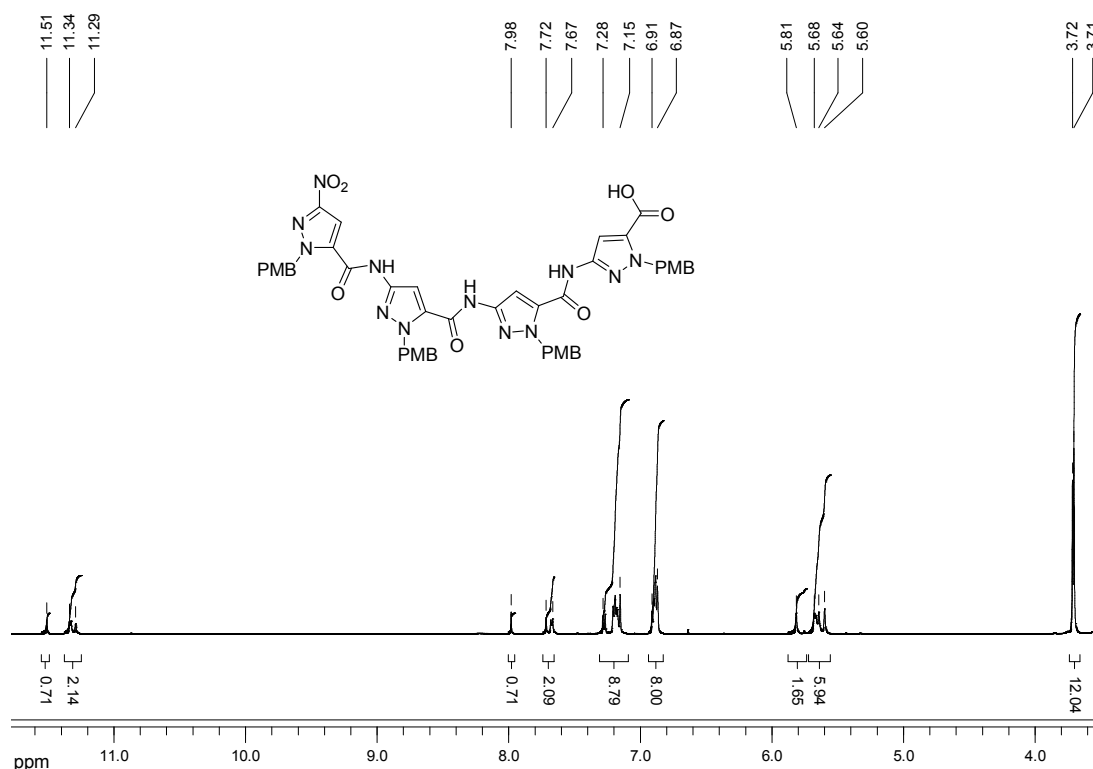


Abb. 178: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **98** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 500 MHz).

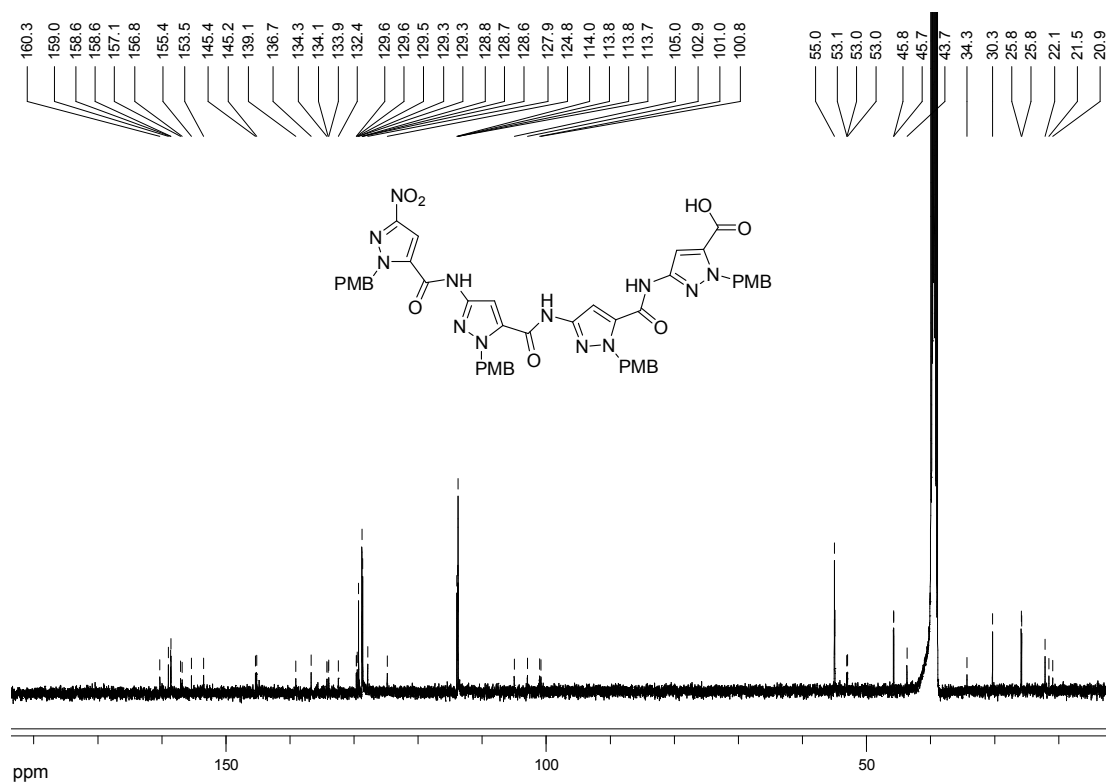


Abb. 179: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **98** (DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K, 125 MHz).

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
Ac	Acetyl
AD	Alzheimer'sche Krankheit
ADDLs	A $\beta$ -derived diffusible ligands
Aib	Aminoisobuttersäure
Ala, A	Alanin
APP	Amyloid Precursor Protein
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CD	Circular dichroismus
Che	Cyclohexylethylamin
Chg	Cyclohexylglycin
chGly	Cyclohexylglycin
Cl-HOBt	6-Chlorhydroxybenztriazol
Cys, C	Cystein
Da	Dalton
DAPH	4,5-Dianilinphthalimid
DCHA	Dicyclohexylamin
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N'</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid
Et	Ethyl
eq	Äquivalent
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin

HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His, H	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
k	kilo
Ile, I	Isoleucin
L	Liter
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
m	mili
M	Molar
μ	mikro
Me	Methyl
Met, M	Methionin
mLeu	<i>N</i> -Methyl-leucin
Mukaiyama	2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid
NFTs	neurofibrilläre tangels (Bündel)
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phe, F	Phenylalanin
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
Pro, P	Prolin
PyClop	Chlortripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
Ser, S	Serin
TEG	Triethylenglykol
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
ThT	Thioflavin T
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
Tyr, Y	Tyrosin

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Sipe, *Annual Review of Biochemistry* **1992**, 61, 947.
- [2] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75, 333.
- [3] J.-C. Rochet, P. T. Lansbury Jr., *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, 10, 60.
- [4] C. Soto, *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4, 49.
- [5] R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **1854**, 6, 416.
- [6] R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **1855**, 8, 364.
- [7] H. Bennhold, *Münch. Med. Wochenschr.* **1922**, 69, 1537.
- [8] A. S. Cohen, E. Calkins, *Nature* **1959**, 183, 1202.
- [9] E. D. Eanes, G. G. Glenner, *J. Histochem. Cytochem* **1968**, 16, 673.
- [10] J. D. Termine, E. D. Eanes, D. Ein, G. G. Glenner, *Biopolymers* **1972**, 11, 1103.
- [11] J. L. Jimenez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C.V. Robinson, C. M. Dobson, H. R. Saibil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9196.
- [12] A. Alzheimer, *Allg. Z. Psychiatr.* **1907**, 64, 146.
- [13] A. Alzheimer, *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* **1911**, 4, 356.
- [14] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *Journal of Peptide Science* **2001**, 7, 227.
- [15] M. Pallas, A. Camins, *Current Pharmaceutical Design* **2006**, 12, 4389.
- [16] [www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/illus\\_plaques.html](http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/illus_plaques.html), Stand: 31.03.2009.
- [17] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741.
- [18] Y. H. Suh, F. Checler, *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 469.
- [19] M. S. Wolfe, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2039.
- [20] S. A. Gravina, L. Ho, C. B. Eckman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 7013.
- [21] D. B. Teplow, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **1998**, 5, 121.
- [22] J. Chuyung, D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 51035.
- [23] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353.
- [24] R. Dodel, F. Neff, M. Bacher, *Deutsche Apotheker Zeitung* **2008**, 4, 314.
- [25] V. H. FINDER, R. Glockshuber, *Neurodegenerative Dis.* **2007**, 4, 13.
- [26] J. T. Jarrett, P. T. Lansbury Jr., *Cell* **1993**, 73, 1055.
- [27] M. Arimon, I. Diez-Perez, M. J. Kogan, N. Durany, E. Giralt, F. Sanz, X. Fernandez-Busquets, *FASEB J.* **2005**, 19, 1344.
- [28] J. D. Harper, P. T. Lansbury Jr., *Annual Review of Biochemistry* **1997**, 66, 385.
- [29] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, 307, 262.
- [30] B. Caughey, P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 26, 267.
- [31] A. Lomakin, D. S. Chung, G. B. Benedek, D. A. Kirschner, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1125.
- [32] P. Sengupta, K. Garai, B. Sahoo, Y. Shi, D. J. Callaway, S. Maiti, *Biochemistry* **2003**, 42, 10506.
- [33] P. E. Fraser, J. T. Hguyen, H. Inouye, W. K. Surewicz, D. J. Selkoe, M. B. Podlisny, D. A. Kirschner, *Biochemistry* **1992**, 31, 10716.
- [34] C. J. Pike, D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, C. W. Cotman, *J. Neurosci.* **1993**, 13, 1676.
- [35] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 330.
- [36] N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condrón, A. C. Rigby, D. B. Teplow, *Protein Sci.* **2005**, 14, 1581.
- [37] G. Bitan, S. S. Vollers, G D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 34882.

- [38] G. Bitan, T. T. Ding, M. D. Kirkitadze, P. T. Lansbury, D. B. Teplow, A. Lomakin, G. B. Benedek, *Neurobiology of Aging* **2002**, 23, 556.
- [39] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 460.
- [40] C. Soto, E. M. Castanno, R. A. Kumar, R. C. Beavis, B. Frangione, *Neurosci. Lett.* **1995**, 200, 105.
- [41] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, M. R. Hurle, *Biochemistry* **1995**, 34, 724.
- [42] I. A. Mastrangelo, M. Ahmed, T. Sato, W. Liu, C. Wang, P. Hough, S. O. Smith, *J. Mol. Biol.* **2006**, 358, 106.
- [43] M. D. Kirkitadze, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 1103.
- [44] D. M. Walsh, D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25945.
- [45] T. Ban, M. Hoshino, S. Takahashi, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **2004**, 344, 757.
- [46] C. Goldsberry, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, S. A. Muller, *J. Mol. Biol.* **2005**, 352, 282.
- [47] Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Familienmedizin, *Leitlinie-12: Demenz* (Kurzfassung), Omikron Verlag, Düsseldorf, **2008**.
- [48] J. L. Cummings, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351, 56.
- [49] M. Racchi, M. Mazzucchelli, E. Porello, C. Lanni, S. Govoni, *Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 441.
- [50] R. Bullock, *Expert. Opin. Invest. Drugs* **2004**, 13, 303.
- [51] M. P. Mattson, *Exp. Gerontol.* **2000**, 35, 489.
- [52] C. Behl, B. Moosmann, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, 33, 182.
- [53] G. Halliday, S. R. Robinson, C. Shepard, J. Kril, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, 27, 1.
- [54] R. A. Cherny, K. J. Barnham, T. Lynch, I. Volitakis, Q. X. Li, C. A. McLean, G. Multhaup, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Journal of Structural Biology* **2000**, 130, 209.
- [55] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. S. Kim, X. D. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, 30, 665.
- [56] D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, D. J. Tew, M. T. Fodero-Tavoletti, T. Johannsen, C. L. Masters, K. J. Barnham, R. Cappai, *Biochemistry* **2007**, 46, 2881.
- [57] H. Schugar, D. E. Green, M. L. Bowen, L. E. Scott, T. Storr, K. Böhmerle, F. Thomas, D. D. Allen, P. R. Lockman, M. Merkel, K. H. Thompson, C. Orvig, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1746.
- [58] G. F. Z. da Silva, L.-J. Ming, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3401.
- [59] C. Ha, J. Ryu, C. B. Park, *Biochemistry* **2007**, 46, 6118.
- [60] K. Garai, B. Sahoo, S. K. Kaushalya, R. Desai, S. Maiti, *Biochemistry* **2007**, 46, 10655.
- [61] C. Talmard, A. Bouzan, P. Faller, *Biochemistry* **2007**, 46, 13658.
- [62] J. Ryu, K. Girigoswami, C. Ha, S. H. Ku, C. B. Park, *Biochemistry* **2008**, 47, 5328.
- [63] J. W. Karr, V. A. Szalai, *Biochemistry* **2008**, 47, 5006.
- [64] B.-K. Shin, S. Saxena, *Biochemistry* **2008**, 47, 9117.
- [65] E. Giacobini, *J. Neural. Transm. Suppl.* **2002**, 181.
- [66] M. I. Rodriguez-Franco, M. I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, B. Hernandez-Ledesma, B. Bartolome, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 459.
- [67] Q. Xie, H. Wang, Z. Xia, M. Lu, W. Zhang, W. Fu, Y. Tang, W. Sheng, W. Li, W. Zhu, Z. Qui, H. Chen, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2027.



- [68] P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, T. Gomez, D. Munoz-Torrero, M. Scarpellini, E. Viayna, A. Badia, M. V. Clos, A. Camins, M. Pallas, M. Bartolini, F. Manicini, V. Andrisano, J. Estelrich, M. Lizondo, A. Bidon-Chanal, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3588.
- [69] M. R. Farlow, *Geriatrics* **2004**, *59*, 22.
- [70] M. Rosini, E. Simoni, M. Bartolini, A. Cavalli, L. Ceccarini, N. Pascu, D. W. McClymont, A. Tarozzi, M. L. Bolognesi, A. Minarini, V. Tumiatti, V. Andrisano, I. R. Mellor, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381.
- [71] A. Monsonogo, H. L. Weiner, *Science* **2003**, *302*, 834.
- [72] D. L. Brody, D. M. Holtzman, *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, *31*, 175.
- [73] T. Tomita, T. Iwatsubo, *Drug News Perspect.* **2004**, *17*, 321.
- [74] M. Citron, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 677.
- [75] H. LeVine, III., *J. Alzheimer's Dis.* **2004**, *6*, 303.
- [76] P. St. Georg-Syslop, C. Haass, *Nature Medicine* **2008**, *14*, 711.
- [77] J. C. Barrow, S. R. Stauffer, K. E. Rittle, P. L. Ngo, Z. Q. Yang, H. G. Selnick, S. L. Graham, S. Munshi, G. B. McGaughey, M. K. Holloway, A. J. Simon, E. A. Price, S. Sankaranarayanan, D. Colussi, K. Tugusheva, M-T. Lai, A. S. Espeseth, M. Xu, Q. Huang, A. Wolfe, B. Pietrak, P. Zuck, D. A. Levorse, D. Hazuda, J. P. Vacca, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6259.
- [78] A. K. Ghosh, N. Kumaragurubaran, L. Hong, H. Lei, K. A. Hussain, C.-F. Liu, T. Devasamudram, V. Weerasena, R. Turner, G. Koelsch, G. Bilcer, J. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5310.
- [79] S. J. Patey, E. A. Edwards, E. A. Yates, J. E. Turnbull, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6129.
- [80] L. Rajendran, A. Schneider, G. Schlechtingen, S. Weidlich, J. Ries, T. Braxmeier, P. Schwill, J. B. Schulz, C. Schroeder, M. Simons, G. Jennings, H.-J. Knöckler, K. Simons, *Science* **2008**, *320*, 520.
- [81] S. Geschwindner, L.-L. Olsson, J. S. Albert, J. Deinum, P. D. Edwards, T. de Beer, r. H. A. Folmer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5903.
- [82] S. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2553.
- [83] E. D. Roberson, L. Mucke, *Science* **2006**, *314*, 781.
- [84] P. Rzepecki, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg/Lahn, **2004**.
- [85] L. D. Estrada, C. Soto, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, *7*, 115.
- [86] A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12243.
- [87] D. Allsop, D. Howlett, G. Christie, E. Karran, *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 459.
- [88] R. Kisilevsky, L. J. Lemieux, P. E. Fraser, X. Kong, P. Hultin, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 143.
- [89] T. Tomiyama, A. Shoji, K. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, N. Endo, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6839.
- [90] S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brzozowski, G. A. Bubenik, *J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *58*, 23.
- [91] P. Zatta, G. Tognon, P. Carampin, *Journal of Pineal Research* **2003**, *35*, 98.
- [92] C. W. Ritchie, A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherry, Q. X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1685.
- [93] K. Ono, K. Hasegawa, H. Nakai, M. Yamada, *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 172.
- [94] K. Ono, K. Hasegawa, H. Nakai, M. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1690*, 193.
- [95] K. Ono, K. Hasegawa, H. Nakai, M. Yamada, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742.
- [96] F. Yang, G. P. Lim, A.N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. Cheng, R. Kayed, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 5892.

- [97] C. Hilbich, B. Kisterswoike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 460. (Abbildung: L. C. Serpell, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1502, 16.)
- [98] L. O. Tjernberg, C. Lilliehöök, D. J. E. Callaway, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 12601.
- [99] L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindquist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 8545.
- [100] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2001**, 40, 7882.
- [101] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **1999**, 38, 3570.
- [102] J. Ghanta, C. L. Shen, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 29525.
- [103] T. J. Gibson, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2005**, 44, 8898.
- [104] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2001**, 40, 8237.
- [105] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *Journal of Peptide Research* **2002**, 60, 37.
- [106] E. Hughes, R. M. Burke, A. J. Doig, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 25109.
- [107] D. J. Gordon, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2003**, 42, 475.
- [108] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Hoppener, G. Posthuma, C. J. M. Lips, R. M. J. Liskamp, *Chemistry-a European Journal* **2002**, 8, 4285.
- [109] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Hoppener, G. Posthuma, C. J. M. Lips, R. M. J. Liskamp, *Biopolymers* **2003**, 71, 324.
- [110] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Arico-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J.-J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward, S. M. Molineaux, *Biochemistry* **1999**, 38, 6791.
- [111] M. A. Findeis, J. J. Lee, M. Kelly, J. D. Wakefield, M. H. Zhang, J. Chin et al., *Amyloid* **2001**, 8, 231.
- [112] M. A. Findeis, S. M. Molineaux, *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 476.
- [113] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano, B. Frangione, *Nat. Med.* **1998**, 4, 822.
- [114] C. Adessi et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 13905.
- [115] R. U. Ostrovskaya et al., *J. Psychopharmacol.* **2006**, 21, 611.
- [116] N. Kokkoni, K. Stott, H. Amijee, J. M. Mason, A. J. Doig, *Biochemistry* **2006**, 45, 9906.
- [117] <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=7323>, Stand: 08.03.2009.
- [118] A. Shanmugam, B. Monien, G. Bitan, *Research Progress in Alzheimer's Disease and Dementia*, Chapter VIII, Nova Science Publishers Inc., **2008**.
- [119] J. McLaurin, R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel, P. E. Fraser, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18495.
- [120] J. McLaurin, M. E. Kierstead, M. E. Brown, C. A. Hawkes, M. H. L. Lambermon, A. L. Phinney, A. A. Darabie, J. E. Cousins, J. E. French, M. F. Lan, F. Chen, S. S. N. Wong, H. T. J. Mount, P. E. Fraser, D. Westaway, P. St. George-Hyslop; *Nat. Med.* **2006**, 12, 801.
- [121] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 748.
- [122] K. Wiesehan, J. Stöhr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner, D. Willbold, *Protein Engineering Design & Selection* **2008**, 21, 241.
- [123] G. Bitan, B. Tarus, S. S. Vollers, H. A. Lashuel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15359.
- [124] B. Y. Feng, B. H. Toyama, H. Wille, D. W. Colby, S. R. Collins, B. C. H. May, S. B. Prusiner, J. Weissman, B. K. Shoichet, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 2.
- [125] T. Cohen, A. Frydman-Marom, M. Rechter, E. Gazit, *Biochemistry* **2006**, 45, 4727.

- [126] M. L. Bolognesi, R. Banzi, M. Bartolini, A. Cavalli, A. Tarozzi, V. Andrisano, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, C. Bergamini, R. Fato, G. Lenaz, P. Hrelia, a. Cattaneo, M. Recanatini, C. Mechiorre, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4882.
- [127] D. P. Flherty, S. M. Walsh, T. Kiyota, Y. Dong, T. Ikezu, J. L. Vennerstrom, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4986.
- [128] B. M. Austen, K. E. Paleologou, S. A. E. Ali, M. M. Quershi, D. Allsop, O. M. A. El-Agnaf, *Biochemistry* **2008**, *47*, 1984.
- [129] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J.-N. Octave, S. O. Smith, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5503.
- [130] T. L. S. Benzinger, D. M. Gregory, T. S. Burkoth, H. Miller-Auer, D. G. Lynn, R. E. Botto, S. C. Meredith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13407.
- [131] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13045.
- [132] M. Torok, S. Milton, R. Kayed, P. Wu, T. McIntire, C. G. Glabe, R. Langen, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40810.
- [133] A. Frydman-Marom, M. Rechter, I. Shefler, Y. Bram, D. E. Shalev, E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1981.
- [134] T. Schrader, C. Kirsten, *Chem. Commun.* **1996**, 2089.
- [135] C. N. Kirsten, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12061.
- [136] M. Wehner, *Dissertation*, Phillips-Universität Marburg, **2002**.
- [137] P. Rzepecki, M. Wehner, O. Molt, R. Zadmard, K. Harms, T. Schrader, *Synthesis* **2003**, *12*, 1815.
- [138] P. Rzepecki, H. Gallmeier, N. Geib, K. Cernovska, B. König, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5168.
- [139] K. Cernovska, M. Kemter, H. Gallmeier, P. Rzepecki, T. Schrader, B. König, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1603.
- [140] P. Rzepecki, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3016.
- [141] T. Schrader, D. Riesner, P. Rzepecki, O. Molt, R. Zadmard, M. Wehner, L. Nagel-Steger, K. Aschermann, C. Kirsten, Deutsches Patent DE 102 21 052.7, **2002**.
- [142] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadmard, K. Aschermann, M. Wehner, T. Schrader, D. Riesner, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47497.
- [143] Die Molekül-Dynamik-Simulationen wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Sticht berechnet.
- [144] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342.
- [145] H. LeVine, III, *Methods in Enzymology* **1999**, *309*, 274.
- [146] B. R. Henke, C. J. Aquino, L. S. Birkemo, D. K. Croom, R. W. Dougherty, G. N. Ervin, M. K. Grizzle, G. C. Hirst, M. K. James, M. F. Johnson, K. L. Queen, R. G. Sherrill, E. E. Sugg, E. M. Suh, J. W. Szewczyk, R. J. Unwalla, J. Yingling, T. M. Willson, *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 2706.
- [147] S. W. Goldstein, L. E. Overman, M. H. Rabinowitz, *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 1179.
- [148] J. Elguero, C. Marzin, A. Katritzky, P. Linda, *The Tautomerism of Heterocycles, Adv. Heterocyclic Chem.* **1976**, *Suppl 1*, 272.
- [149] Y. S. Lu, H. B. Kraatz, *Inorganic Chemistry Communications* **2003**, *6*, 666.
- [150] Y. S. Lu, H. B. Kraatz, *Inorganic Chemistry Communications* **2004**, *7*, 382.
- [151] Y. S. Lu, H. B. Kraatz, *Inorganica Chimica Acta* **2004**, *357*, 159.
- [152] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley Sons, Inc., Hoboken, **1999**.
- [153] C.-L. Shen, R. M. Murphy, *J. Biophys.* **1995**, *69*, 640.

- [154] H. H. Lee, B. F. Cain, W. A. Denny, J. S. Buckleton, G. R. Clark, *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 428.
- [155] C. Subramanyam, *Synthetic Communications* **1995**, *25*, 761.
- [156] P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8119.
- [157] E. Bald, K. Saigo, T. Mukayima, *Chem. Lett.* **1975**, 1163.
- [158] T. Mukaiyama, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 798.
- [159] F.-G. Klärner, J. Polkowska, J. Panitzky, U. P. Seelbach, U. Burkert, M. Kamieth, M. Baumann, A. E. Wigger, R. Boese, D. Bläser, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1405.
- [160] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.
- [161] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- [162] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press Inc., New York, **2004**.
- [163] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- [164] A. Maddar, N. Farcy, N. G. C. Hosten, H. De Muynck, P. J. De Clercq, J. Barry, A. P. Davis, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 2787.
- [165] M. J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kelarakis, I. W. Hamley, R. A. Hule, d. J. Pochan, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4597.
- [166] H. Nakai, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, *Analytical Biochemistry* **1989**, *177*, 244.
- [167] H. LeVine, III, *Protein Science* **1993**, *2*, 404.
- [168] H. LeVine, III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **1995**, *2*, 1.
- [169] H. LeVine, III, *Amyloid* **2005**, *12*, 5.
- [170] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, A. M. Donald, *Journal of Structural Biology* **2005**, *149*, 30.
- [171] S. W. Snyder, U. S. Lador, W. S. Wade, G. T. Wang, L. W. Barrett, E. D. Matayoshi, H. J. Huffaker, G. A. Krafft, T. F. Holzman, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1216.
- [172] M. G. Zargorski, J. Yang, H. Shao, H. Zeng, A. Hong, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 189.
- [173] H. Nakai, K. Nakakuki, *Nature Lab. Invest.* **1996**, *74*, 374.
- [174] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22364.
- [175] M. D. Kirkitadze, M. M. Condron, D. B. Teplow, *J. Mol. Biol.* **2001**, *312*, 1103.
- [176] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693.
- [177] P. Inbar, M. R. Bautista, A. A. Takayama, J. Yang, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3502.
- [178] H.-J. Galla, H.-J. Müller, *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1998**.
- [179] G. Snatzke, *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 15.
- [180] F. Snatzke, G. Snatzke, *Z. Anal. Chem.* **1977**, *285*, 97.
- [181] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, *1751*, 119.
- [182] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley-VCH, New York, **2000**, pp. 877.
- [183] S. Brahms, J. Brahms, *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 149.
- [184] C. J. Barrow, A. Yasuda, P. T. M. Kenny, M. G. Zargorski, *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*, 1075.
- [185] H. Diaz, K. Y. Tsang, D. Choo, J. R. Espina, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 370.
- [186] K. Y. Tsang, H. Diaz, N. Graciani, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 3988.
- [187] D. W. Choo, J. P. Schneider, N. R. Graciani, J. W. Kelly, *Macromolecules* **1996**, *29*, 355.

- [188] C. L. Nesloney, J. W. Kelly, *Biorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 739.
- [189] M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5740.
- [190] S. T. Hess, S. H. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* **2002**, 41, 697.
- [191] T. Svedberg, K. O. Peterson, *The Ultracentrifuge*, Johnson Reprint Corp., New York, **1940**, pp. 478.
- [192] T. M. Laue, W. F. Stafford, III, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 75.
- [193] [www.nanolytics.de/auz/auz\\_einf.pdf](http://www.nanolytics.de/auz/auz_einf.pdf), Stand: 26.12.2008.
- [194] [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com), Stand: 26.12.2008.
- [195] O. Lamm, *Ark. Mat. Astr. Fys.* **1929**, 21, 1.
- [196] A. Melchior, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, *Diplomarbeit*, **2005**.
- [197] P. Schuck, *Biophysical Journal* **2000**, 78, 1606.
- [198] P. Schuck, M. A. Perugini, N. R. Gonzales, G. J. Hoowlett, D. Schubert, *Biophysical Journal* **2002**, 82, 1096.
- [199] L. Nagel-Steger, B. Demeler, W. Meyer-Zaika, K. Hochdörffer, T. Schrader, D. Willbold, *European Biophysics Journal* **2009**, in press.
- [200] N. Scharnagl, M. Schossig, *Chemie Ingenieur Technik* **2005**, 77, 517.
- [201] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, S. A. Müller, *J. Mol. Biol.* **2005**, 352, 282.
- [202] J. Zheng, H. Jang, B. Ma, C.-J. Tsai, R. Nussinov, *Biophysical Journal* **2007**, 93, 3046.
- [203] S. P. Brown, T. Schaller, U. P. Seelbach, F. Koziol, C. Ochsenfeld, F.-G. Klärner, H. W. Spiess, *Angew. Chemie* **2001**, 40, 717.
- [204] R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 96.
- [205] R. Tycko, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, 39, 1.
- [206] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *J. Pept. Res.* **2002**, 63, 324.
- [207] A. Neagu, M. Neagu, A. Der, *Biophys. J.* **2001**, 81, 1285.
- [208] M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 241.
- [209] Y. Porat, Y. Mazor, S. Efrat, E. Gazit, *Biochemistry* **2004**, 43, 14454.
- [210] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, 67, 27.
- [211] T. Cohen, A. Frydman-Marom, M. Rechter, E. Gazit, *Biochemistry* **2006**, 45, 4727.
- [212] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 22. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
- [213] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3<sup>rd</sup> ed., Pergamon Press, New York, **1988**.
- [214] K.-D. M. Maue, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, 2006.
- [215] H. Friebolin, *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1999**.
- [216] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *150 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course*, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley-VCH, New York, **1998**.
- [217] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1975**, 64, 2229.
- [218] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2093.
- [219] C. Subramanyam, J. P. Mallamo, G. M. Pilling, W. G. Earley, P. M. Carabateas, J. R. Wetzel, D. Dehavenhudkins, T. Allen, R. K. Kullnig, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 2483.
- [220] W. Sun, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Campus Essen, **2009**.

## LEBENS LAUF

Name	Katrin Hochdörffer
Geburtsdatum	11. Oktober 1979
Geburtsort	Grünstadt
Familienstand	verheiratet

Staatsangehörigkeit	deutsch
---------------------	---------

### Schulausbildung

1986 - 1990	Grundschule, Dirmstein
1990 - 1999	Albert-Einstein-Gymnasium, Frankenthal
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10 / 1999 – 03 / 2005	Studium der Chemie (Note 1,9) Technische Universität Kaiserslautern Diplomarbeit zum Thema: „Neue synthetische Zugänge zu L-Pentose-Derivaten“ Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG, Ingelheim
-----------------------	---

### Promotion

11 / 2005	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. T. Schrader am Fachbereich Chemie der Universität Marburg Titel der Dissertation: „Oligomere Aminopyrazole gegen die pathologische Aggregation des Alzheimer-Peptids“
08 / 2006 – 03 / 2009	am Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen